



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
**2001**

**Sara Cristina Ferreira  
Marques Antunes**

**variabilidade clonal de respostas crónicas de  
*Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares**



**Sara Cristina Ferreira  
Marques Antunes**

**variabilidade clonal de respostas crónicas de  
*Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências das Zonas Costeiras, realizada sob a orientação científica do Doutor Fernando Gonçalves, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira  
professora associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Eduardo da Silva  
professor adjunto III da Universidade Federal da Bahia

Prof. Doutor Fernando Gonçalves  
professor auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho foram inúmeras as pessoas que, de algum modo (incentivando, ajudando, compreendendo as ausências ao fim-de-semana, fazendo-me o jantar ...), proporcionaram a sua realização e às quais não posso deixar de agradecer.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Prof. Doutor Fernando Gonçalves que acreditou em mim e me orientou, neste e noutros trabalhos, ao longo deste meu percurso, desde o final da licenciatura.

Queria agradecer à Prof<sup>a</sup> Doutora Conceição Santos por me ter facilitado a utilização de material para a execução de ilustrações dos organismos.

Em seguida, a todos os meus colegas de laboratório: Ruth, Anabela, Catarina, Ana Ré, João Pestana, Nelson, Abel, um obrigado especial pela colaboração e compreensão (pelas bancadas sempre cheias de frascos ...).

Aos meus colegas e amigos Joca, Nat, Sérgio, Marta, Ana Margarida, Maria João, Lísia, Paula (e peço desculpa se me estou a esquecer de alguém) pelos intervalos para ir beber café e “ir desanuviar” um pouco à noite conveersando um grande obrigado.

Para uma pessoa especial que desde que se tornou filha adoptiva de Aveiro tem sido uma grande amiga, um obrigado sem dimensões por tudo (pelos jantares, limpezas da casa, os meus stresses ...). Obrigado Sónia!!

Um agradecimento enorme à minha família, principalmente Mãe, Pai e Nuno, por me terem encorajado, compreendido e apoiado a minha opção. Sem o vosso apoio não teria sido possível a minha dedicação a este trabalho.

Ao Bruno ..., não existem palavras que consigam expressar todo o meu agradecimento. Obrigado pelo apoio, compreensão, pelas opiniões, pela análise estatística, .... por tudo. Obrigado por seres quem és!!!

## resumo

Os ovos de resistência são uma estratégia fundamental na reprodução dos zooplancantes de água doce, nomeadamente em cladóceros. As ephippia são formadas sob condições ambientais adversas (e.g., sobrepopulação, baixas temperaturas, nível alimentar alto/baixo) como consequência de reprodução sexuada, ao contrário do ciclo partenogénico habitual. Sob estas condições adversas, populações inteiras de cladóceros (e.g. *Daphnia*) podem desaparecer de um lago e uma nova comunidade irá surgir a partir de bancos de ovos ephippiais. Dado que estas novas populações estão sujeitas à variação genética, as suas respostas a alterações ambientais ou a contaminantes poderão ser diferentes das da população “original”. No presente trabalho, foram estudadas as respostas crónicas (crescimento, reprodução, demografia) de vários clones de *Daphnia longispina* a diferentes níveis alimentares. Os ensaios foram realizados com dois tipos de clones originários de duas populações diferentes (lagoas da Vela e de Mira) de *D. longispina*: a) clones de campo – indivíduos colhidos no campo foram aclimatizados e mantidos em laboratório durante várias gerações; b) clones ephippiais – organismos eclodidos de ephippia colhidas no campo foram sujeitos às mesmas condições laboratoriais que os clones de campo. O nível alimentar (*Selenastrum capricornutum*) foi o factor testado (ausência de alimento e reduzido a elevado nível alimentar). Foram observadas diferenças entre clones, independentemente da sua lagoa de origem ou da sua proveniência (campo ou ephippia). Não foi, portanto, possível observar uma tendência clara entre as duas populações, ou entre os clones ephippiais e de campo, para os níveis alimentares testados. Todavia, outros autores têm frisado que, na análise da variabilidade clonal de respostas alimentares, devem ser considerados não só a quantidade, mas também a qualidade e diversidade (nomeadamente os *taxa* presentes) do alimento. A importância da variabilidade clonal no processo evolutivo dos cladóceros dulçaquícolas justifica que, no futuro, mais estudos se dediquem à avaliação das respostas a diferentes factores de stress (e.g., contaminantes), entre as populações de campo e as populações derivadas de bancos de ovos de resistência.

## abstract

Resting eggs are a fundamental reproductive strategy among freshwater cladocerans. *Ephippia* are formed under adverse environmental conditions (e.g., crowding, low temperatures, low/high food level) as a consequence of sexual reproduction, unlike the normal partenogenic cycle. Under these adverse conditions, whole *Daphnia* populations can disappear from a lake and a new community will arise from *ephippial* egg banks. Since these new populations are subjected to genetic variation, their responses to environmental stress or contaminants can be different from the “original” population. In the present study, life-history responses (growth, reproduction, and demography) of several clones of *Daphnia longispina* to different food levels were studied. Tests were performed with two types of clones originated from two *Daphnia* populations (Mira and Vela lakes): a) field clones – several field-collected individuals were acclimated and reared in the laboratory for several generations; b) *ephippial* clones – individuals hatched from field-collected *ephippia* were subjected to the same laboratory conditions as field clones. Food (*Selenastrum capricornutum*) level was the stressor tested (absence of food, and low to high food levels). Differences among clones were observed, independently of coming from the field or *ephippia*, and from their lake of origin. No clear trend was therefore observed between the two populations or between field and *ephippial* clones, for the tested food levels. However, when analysing clonal variation in feeding responses, one should consider not only the quantity of the food, but also its quality and diversity (namely, algal *taxa*). Still, further studies should be developed in order to evaluate the different responses to stressors (e.g., environmental contaminants), among field and *ephippia*-derived populations.

## ÍNDICE

	Pág.
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
I – INTRODUÇÃO	1
I.1. Ecossistemas dulçaquícolas lênticos	3
I.2. <i>Daphnia</i> como organismo de estudo	5
I.2.1 – Reprodução em <i>Daphnia</i>	7
I.2.2 – Eclosão de ovos de resistência	9
I.2.3 - Respostas de <i>Daphnia</i> a diferentes níveis alimentares	10
I.3. Objectivos	12
II - Material e Métodos	13
II.1. Colheita e manutenção das culturas	15
II.1.1 – Locais de Colheita	15
II.1.2 – Material Biológico	16
II.1.3 – Manutenção das Culturas	18
II.2. Testes de alimentação	23
II.2.1 - Preparação e Execução do Teste	23
II.2.2 - Parâmetros Biológicos	24
II.3. Análise estatística	27
III – RESULTADOS	29
III.1 – Mortalidade	31
III.2 - Parâmetros Parciais das Ninhadas	32
III.2.1 - Número de neonatos por ninhada	32
III.2.2 – Biomassa média de neonatos	36
III.2.3 – Comprimento médio dos neonatos	39
III.3 – Reprodução, Crescimento e Parâmetros Populacionais	42
III.3.1 – Parâmetros reprodutivos	46
III.3.1.1 - Idade à primeira reprodução	46
III.3.1.2 – Número total de neonatos	47

III.3.1.3 – <i>Número e biomassa total das ninhadas</i>	48
III.3.2 – Taxa de crescimento diário	50
III.3.3 – Taxa de incremento populacional	51
III.4 - Análise Multivariável	52
IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	53
1V –Discussão e conclusões	55
Conclusões	59
V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	



## Lista de Figuras

Figura I.1 – Esquema representativo de um exemplar do género *Daphnia* (adaptado a partir da figura disponível em <http://biodidac.bio.uottawa.ca/>).

Figura I.2 – Fotografias de A) Fêmea adulta de *D. longispina* com *ephippium*, e B) Duas *ephippia* de *D. longispina*.

Figura II.1 – Localização das lagoas de Mira (A) e da Vela (B).

Figura II.2 – A) Adultos de *Daphnia longispina* B) *Ephippia* de *D. longispina*

Figura II.3 – Esquema representativo do sistema de cultura da alga *Selenastrum capricornutum*. 1) Cultura de *S. capricornutum* em meio de cultura MBL; 2) Tubo de arejamento (seta assinala a entrada de ar); 3) Tubo de saída de ar protegido com uma rolha de gaze; 4) Filtro de 0,2 mm; 5) Tubo de transferência de meio.

Figura II.4 – Imagem representativa do modo de medição do 1º exopódito da 2ª antena numa *exuviae* de *D. longispina*.

Figura II.5 – Esquema exemplificativo do método de medição do corpo de *Daphnia longispina*, desde o topo da cabeça até à base do espinho caudal.

Figura III.2.1.1 – Número médio de neonatos por fêmea registado em cada ninhada, para os clones EV6, EV20, V3, V5 e V8. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

Figura III.2.1.2 – Número médio de neonatos por fêmea registado em cada ninhada, para os clones EM1, EM6, EM7, M1 e M5. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

Figura III.2.2.1 – Biomassa média de neonatos (mg) produzidos em cada ninhada, para os clones EV6, EV20, V3, V5 e V8. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

Figura III.2.2.2 – Biomassa média de neonatos (mg) produzidos em cada ninhada, para os clones EM1, EM6, EM7, M1 e M5. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

Figura III.2.3.1 – Comprimento médio do corpo dos neonatos (mm) produzidos em cada ninhada para os clones EV6, EV20, V3, V5 e V8. As barras de erro indicam o desvio padrão,

e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

Figura III.2.3.2 – Comprimento médio do corpo dos neonatos (mm) produzidos em cada ninhada para os clones EM1, EM6, EM7, M1 e M5. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

Figura III.3.1.1.1 - Tempo à primeira reprodução nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

Figura III.3.1.2.1 - Número total de neonatos por fêmea nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c,d) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

Figura III.3.1.3.1 - Biomassa total das ninhadas (mg) nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

Figura III.3.1.4.1 - Número de ninhadas nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

Figura III.3.2.1.1 - Taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

Figura III.3.3.1.1 - Taxa de incremento populacional nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

Figura III.4.1 - Dendrograma obtido por uma análise de classificação (UPGMA, correlação de Pearson) através das respostas médias de cada clone aos diferentes níveis alimentares.

## Lista de Tabelas

Tabela II.1 – Composição química do meio de cultura sintético “ASTM hard water” e suas características físicas (*adaptado de* ASTM, 1980).

Tabela II.2 – Composição química do meio de cultura de *Selenastrum capricornutum* MBL (*adaptado de* Soares, 1989).

Tabela II.3 – Composição química do extracto da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e quantidades relativas na forma de pó seco (*adaptado de* Soares, 1989).

Tabela III.1.1 - Mortalidade (em percentagem) observada ao fim de 21 dias de exposição de *Daphnia longispina* a diferentes concentrações alimentares (*S. capricornutum*). As diferentes letras (a,b) representam as diferenças significativas entre as concentrações (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

Tabela III.3.1 – Tabela sumário da ANOVA bifactorial para os parâmetros obtidos no ensaio de *Daphnia longispina* com diferentes concentrações de alimento. A idade à primeira reprodução (dias), o número total de neonatos, a biomassa total das ninhadas (mg), o número de ninhadas, a taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) e a taxa de incremento populacional ( $\text{dia}^{-1}$ ) foram analisados, visando detectar os efeitos dos clones, do nível alimentar e a sua interacção, (g.l – graus de liberdade).

Tabela III.3.2 – Tabela sumário da ANOVA unifactorial para os parâmetros obtidos no ensaio de *Daphnia longispina* (clones provenientes da lagoa da Vela) com diferentes concentrações de alimento. A idade à primeira reprodução (dias), o número total de neonatos, a biomassa total das ninhadas (mg), o número de ninhadas, a taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) e a taxa de incremento populacional ( $\text{dia}^{-1}$ ) foram analisados, visando detectar os efeitos do nível alimentar para cada clone. A negrito são evidenciados os valores para os quais não se registaram diferenças significativas, (g.l – graus de liberdade).

Tabela III.3.3 – Tabela sumário da ANOVA unifactorial para os parâmetros obtidos no ensaio de *Daphnia longispina* (clones provenientes da lagoa de Mira) com diferentes concentrações de alimento. A idade à primeira reprodução (dias), o número total de neonatos, a biomassa total das ninhadas (mg), o número de ninhadas, a taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) e a taxa de incremento populacional ( $\text{dia}^{-1}$ ) foram analisados, visando detectar os efeitos do nível alimentar para cada clone. A negrito são evidenciados os valores para os quais não se registaram diferenças significativas, (g.l – graus de liberdade).

## **I – INTRODUÇÃO**



# I - INTRODUÇÃO

## I.1. ECOSISTEMAS DULÇAQUÍCOLAS LÊNTICOS

A elevada susceptibilidade dos ecossistemas aquáticos de água doce à acção antropogénica tem resultado num crescente interesse na compreensão dos mecanismos funcionais das suas componentes bióticas e abióticas, principalmente em sistemas lênticos. A qualidade da água dos ecossistemas lênticos, sua constituição e mistura na coluna de água são factores essenciais dos quais os organismos dependem para um bom desenvolvimento (Weithoff *et al.*, 2000). Deste modo, as comunidades planctónicas são importantes indicadores do estado de um sistema lêntico, na medida em que reflectem a disponibilidade de nutrientes e a produtividade desse ambiente (DeSanto, 1978). A complexa teia alimentar encontrada em lagos e lagoas (bacterioplâncton/fitoplâncton-zooplâncton-necton) assenta num delicado e dinâmico equilíbrio entre as diversas componentes. A concentração de nutrientes, a taxa de herbivoria e a predação são inter-dependentes e modulam a estrutura das comunidades planctónicas, bem como da teia alimentar (Medina-Sánchez *et al.*, 1999), levando à ocorrência de uma sucessão ecológica mais ou menos cíclica (Dohet e Hoffmann, 1995). O equilíbrio desta sucessão ecológica é facilmente alterado pela acção humana, levando a alterações em toda a teia alimentar, afectando os mecanismos reguladores “top-down” e “down-top”, isto é, controlo por parte dos níveis tróficos mais elevados sobre os níveis de base e vice-versa (DeSanto, 1978).

O equilíbrio entre as componentes dum sistema aquático pode ser altamente afectado com a alteração de algumas situações, tais como a disponibilidade de energia solar e o transporte de água e outros materiais orgânicos provenientes da bacia hidrográfica. O fenómeno da eutrofização tem vindo a ser observado em vários sistemas aquáticos e caracteriza-se por um desequilíbrio do sistema aquático devido a uma entrada excessiva de nutrientes e consequente incapacidade dos organismos para os consumirem (Leaf e Chatterjee, 1999). O enriquecimento das águas com nutrientes resulta, normalmente, da interacção entre o sistema e os terrenos circundantes, sendo este o principal factor de eutrofização dos sistemas aquáticos. Uma vez mais, a acção antropogénica sobre os recursos

naturais é a principal razão para a intensificação do processo de eutrofização (Leaf e Chatterjee, 1999). Os hábitos humanos, como a libertação indiscriminada de esgotos domésticos, a utilização de fertilizantes e o excesso de indústria e seus resíduos são práticas que levam a uma deterioração mais rápida dos ecossistemas de água doce.

O fitoplâncton é o primeiro elo da cadeia alimentar, sendo o grupo mais directamente afectado pela quantidade de nutrientes disponíveis no meio. Este é um caso clássico de desregulação da base da teia trófica de lagos e lagoas. O enriquecimento de nutrientes leva a um crescimento exacerbado de alguns taxa fitoplanctónicos oportunistas (por vezes tóxicos para os zooplancntones) que não irão ser consumidos e que podem provocar a morte em massa de outros organismos na teia alimentar (Barros, 1994; Ferrão-Filho *et al.*, 2000). Este processo leva frequentemente a estados reduzidos de oxigénio na água provocando por vezes a morte dos organismos ainda existentes no sistema. As comunidades zooplanctónicas e fitoplanctónicas são igualmente afectadas através de uma redução drástica na sua diversidade, morrendo as espécies mais sensíveis e havendo um aumento das espécies oportunistas, com a capacidade de tirar alguma mais valia da grande disponibilidade de nutrientes (Barros, 1994). O aumento na produtividade primária e da vegetação das margens provoca também uma redução da profundidade do lago devido à elevada deposição de matéria orgânica reduzindo assim o espaço, por vezes essencial, para que ocorram determinados fenómenos (*e.g.* migrações de cladóceros).

O zooplâncton dulçaquícola é muito variado sendo principalmente constituído por cladóceros (*e.g.* *Daphnia*, *Ceriodaphnia*, *Bosmina*), copépodes e rotíferos. Numa comunidade zooplanctónica, há que considerar a variabilidade sazonal da distribuição dos organismos. A sucessão ecológica destes organismos é observada ao longo do ano sendo as espécies substituídas consoante as condições ambientais existentes. Como exemplo, o pico de existência de *Daphnia longispina* nas lagoas das Braças e Vela (lagoas de Quiaios, Figueira da Fóz) é de Janeiro a Maio, com densidades baixas ou nulas nos restantes meses (Barros, 1994; Silva, 1999). Caracteristicamente, os sistemas lênticos sofrem alterações no nível de nutrientes e no nível da água ao longo de um ano, o que afecta a todos os níveis tróficos, com consequentes *feedbacks* entre estes (Medina-Sánchez *et al.*, 1999). Barros (1994), Pereira (1997) e Silva (1999) demonstraram existir uma clara variabilidade sazonal na



abundância total de zooplantontes nas lagoas da Vela e das Braças, e também na ocorrência e desaparecimento de determinados *taxa*.

## **I.2. DAPHNIA COMO ORGANISMO DE ESTUDO**

Os Cladocera são organismos que se caracterizam por possuírem um ciclo de vida curto, quando comparados aos humanos ou mesmo a outros mamíferos, elevadas taxas de fecundidade e grande sensibilidade a variadíssimos factores de stress, revelando-se, assim, organismos de grande interesse científico. Todas estas características fazem com que sejam óptimos organismos laboratoriais, principalmente por apresentarem baixa variabilidade genética devido ao tipo de reprodução mais frequente que utilizam, partenogénica (ver abaixo). Esta importante característica garante assim a possibilidade de comparação de estudos entre laboratórios. *Daphnia* é um organismo pertencente à ordem Cladocera sendo uma espécie muito abundante nas comunidades zooplantónicas dulçaquícolas. É um organismo de pequenas dimensões e de morfologia muito característica (Fig. I.1). O tipo de alimentação que caracteriza o género *Daphnia* é muito variado, abrangendo diversas substâncias para se alimentar. Sabe-se que é um organismo filtrador e que possui uma dieta bastante diversificada, desde a ingestão de partículas finas de matéria orgânica em suspensão (Lampert, 1987; Ojala *et al.*, 1995), a bactérias, até a diversas algas (Ojala *et al.*, 1995; Michels e De Meester, 1998).

Para a realização deste trabalho foi utilizado a espécie *Daphnia longispina* que pertence a um complexo de várias espécies (*D. ambigua*, *D. hyalina*, *D. galeata*, *D. cucullata*), o qual se caracteriza pela ausência de pente na parte inferior da garra (Hrbáček, 1987). *D. longispina* é uma espécie de menores dimensões que *D. magna* (espécie normalmente cultivada em laboratório para a realização de testes), mas possui requisitos de cultura laboratorial semelhantes.



Figura I.1 – Esquema representativo de um exemplar do gênero *Daphnia* (adaptado a partir da figura disponível em <http://biodidac.bio.uottawa.ca/>).

*Daphnia* tem sido utilizada como organismo padrão em testes laboratoriais e de campo como medida para avaliar o estado de um sistema (De Stasio *et al.*, 1995; Michels e De Meester, 1998). Actualmente o leque de organismos teste vai sendo alargado, tentando abranger outros grupos na cadeia alimentar que apresentem estratégias de vida diferentes (e.g. alga – *Chlorella vulgaris*, insecto - *Chironomus riparius*). Tal situação permite visualizar de uma forma mais real o que pode suceder nas comunidades biológicas de um sistema após a intervenção de um factor de stress. Um assunto que tem levado muitos investigadores a trabalharem com este organismo é a sua variada dieta alimentar. As diferentes espécies de algas existentes nos ecossistemas têm gerado alguns trabalhos de modo a compreender as preferências alimentares de *Daphnia* e de que modo regulam a comunidade planctónica em lagos (Hochstädter, 2000; Martinez e Montecino, 2000; Arbaeiauskas, 2001).

Relativamente à espécie escolhida para o desenvolvimento do presente trabalho, *Daphnia longispina*, o nanoplâncton parece ser o seu principal componente alimentar. No entanto, a sua dieta alimentar pode ser muito variada e sujeita às limitações alimentares existentes (Montel e Lair, 1997). O que caracteriza estes organismos, relativamente ao modo de alimentação é a sua habilidade em filtrar partículas, bactérias de vários tamanhos e algas filamentosas. Quando ocorrem limitações alimentares extremas (normalmente, por escassez)

no ecossistema, a exposição das comunidades biológicas a esse stress provoca alterações profundas na sua composição. Assim, alguns estudos comprovam que a sujeição a limitações alimentares reduz significativamente a fecundidade e o crescimento em *Daphnia* (Montel e Lair, 1997).

## **I.2.1 – REPRODUÇÃO EM *DAPHNIA***

Alguns estudos revelam que as condições ambientais são das principais causas para a alternância de reprodução assexuada e sexuada em cladóceros (Berner *et al.*, 1991; Spaak, 1995). Consoante as condições ambientais em que se encontra, *Daphnia* pode reproduzir-se assexuadamente (reprodução partenogénica) ou sexuadamente (produção de machos e consequente formação de ovos sexuais de resistência - *ephippia*). Os ovos de resistência (*ephippia*) são envoltos por uma membrana protectora que é largada aquando da libertação da exuvia por *Daphnia* (Carvalho e Crisp, 1987). O *ephippium* é formado durante a secreção da nova carapaça, possuindo uma tonalidade transparente passando a castanha aquando da sua libertação. Normalmente dentro destas membranas ephippiais existem dois ovos, nem sempre sendo os dois viáveis (Zaffagnini, 1987). As ovos *ephippia* (Fig I.2) resistem a temperaturas adversas, tubos digestivos de animais (*e.g.* aves, peixes) a períodos de tempo longos enterrados em sedimentos, secagem e até esmagamento (Yampolsky, 1992; Hairston, 1996; Arbaeiuskas, 1998). Adicionalmente, a dispersão destes ovos de resistência pelo vento ou por animais pode ser uma razão plausível para explicar existência, por vezes repentina e ocasional, de determinadas espécies em alguns sistemas aquáticos (Proctor, 1964; Spaak, 1995).

A reprodução partenogénica de *Daphnia*, que predomina sob condições ambientais favoráveis, permite que os organismos das ninhadas duma progenitora original sejam geneticamente idênticos entre eles e relativamente à progenitora, denominando-se de clones. Neste tipo de reprodução, existem duas fases bem distintas. Uma inicial que dura cerca de 10-12 dias (a uma temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e que consiste no amadurecimento dos indivíduos para a reprodução. A segunda fase corresponde ao período reprodutor em que as fêmeas dão origem a indivíduos geneticamente iguais através do processo de partenogénese. O outro tipo de reprodução (sexuada) pode ocorrer quando estes

organismos são expostos a condições ambientais adversas, verificando-se que algumas espécies de copépodes e cladóceros preferem entrar em diapausa (estado de quiescência) ao invés de estarem sujeitos a essas mesmas condições (Pijanowska e Stolpe, 1996). Este estado de dormência parece ser a única estratégia que estes pequenos organismos encontraram para sobreviverem a situações indesejadas (Dahms, 1995). O estado de diapausa em *Daphnia* é uma consequência da ocorrência de condições adversas no sistema dando origem a reprodução sexuada originando ovos de resistência - *ephippia*. Factores abióticos como limitações alimentares extremas (Carvalho e Hughes, 1983; Taylor, 1985) e/ou fotoperíodo reduzido (Stross e Hill, 1965; Bunner e Halcrow, 1977; Carvalho e Hughes, 1983), assim como factores bióticos como elevada densidade populacional (Bunner e Halcrow, 1977; Carvalho e Hughes, 1983; Kleiven *et al.*, 1992) e/ou presença de predadores (Pijanowska e Stolpe, 1996) são as principais variáveis documentadas como responsáveis para a ocorrência de reprodução sexuada (Deng, 1996). Outras razões têm sido encontradas também como responsáveis pela formação de *ephippia* em *Daphnia*: a) florescências de cianobactérias com elevada produção de toxinas (Laurén-Määtä *et al.*, 1997); b) produtos químicos produzidos por peixes (Pijanowska e Stolpe, 1996). Quando algum destes factores adversos ocorre há produção assexuada de machos, podendo ocorrer reprodução sexuada (Zaffagnini, 1987), originando, assim, cruzamento genético. A variação genética desempenha um papel fundamental em termos evolutivos (Hairston, 1996), e as novas populações poderão responder a factores de stress de um modo diferente da população que lhes deu origem.

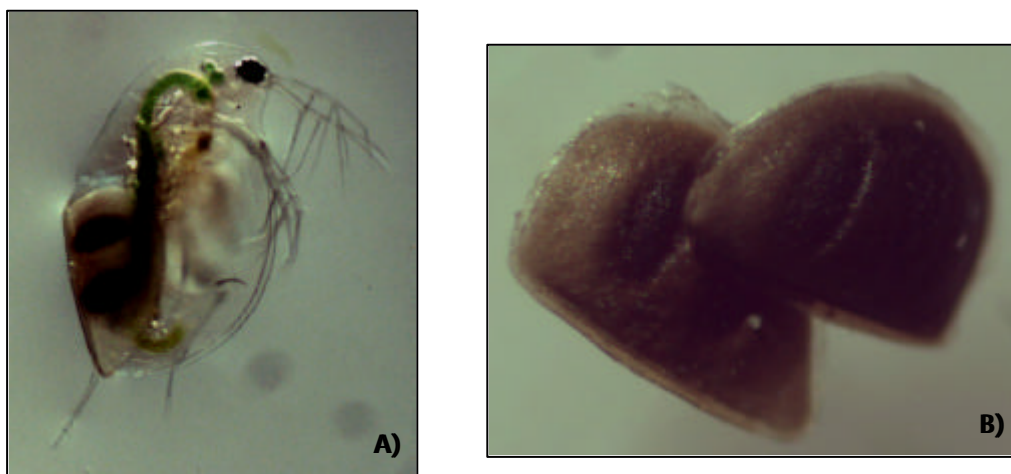


Figura I.2 – Fotografias de A) Fêmea adulta de *D. longispina* com *ephippium*, e B) Duas *ephippia* de *D. longispina*.

## **I.2.2 – ECLOSÃO DE OVOS DE RESISTÊNCIA**

O estado de diapausa termina quando existem condições para que o processo de eclosão das *ephippia* ocorra. Assim, é necessário compreender os factores que envolvem o processo de eclosão destes ovos de resistência, de modo a identificar as condições ideais que estimulam as *ephippia* a originarem novos indivíduos. O processo de eclosão pode ser dividido em duas fases (Stross e Hill, 1968; Davison, 1969; De Meester e De Jager, 1993a, 1993b): a primeira, denominada de período de latência (os ovos de resistência - *ephippia* - estão em repouso) e uma outra fase, descrita como período de eclosão (Stross e Hill, 1968). Davison (1969) demonstrou que o período de armazenamento das *ephippia* é de extrema importância, revelando mesmo que a sua inexistência reduz significativamente a percentagem de eclosão das *ephippia*. Trabalhos mais recentes (De Meester e De Jager, 1993a, 1993b), concordantes com aquele, demonstraram que o período de armazenamento deve ser feito no escuro. Esta fase de latência/armazenamento parece ser fundamental (no campo ou em laboratório), na medida em que constituirá uma preparação prévia do ovo de resistência, sem o qual a eclosão não é possível. Após este período, a intensidade luminosa parece representar um papel preponderante como estímulo de activação do *ephippium*, desencadeando o processo de eclosão.

Numa perspectiva simplista, é possível agrupar as técnicas de eclosão de *ephippia* em três processos distintos: a) Processo químico - lavagens consecutivas das *ephippia* com hipoclorito de sódio (Pancella e Stross, 1963; Mellors, 1975); b) Processo manual - descapsulação dos ovos de resistência (Davison, 1969; Larsson, 1991; De Meester e De Jager, 1993a, 1993b); c) Processo natural – as *ephippia* são postas a eclodir sem qualquer intervenção mecânica ou química (Doma, 1979; Mbritz, 1987; Carvalho e Wolf, 1989; Boersma *et al.*, 2000; Barata *et al.*, 2000). No entanto, para qualquer método de eclosão das *ephippia*, a literatura enumera a existência de três factores primordiais de variação (luz, fotoperíodo e temperatura) que geram alguma discordância entre os autores dos métodos acima mencionados. Pancella e Stross (1963) verificaram que a luz é um estímulo essencial para a eclosão de ovos de resistência. Estudos posteriores demonstraram que, regra geral, o aumento da intensidade luminosa induzia uma maior percentagem de eclosão em cladóceros, o que pode ser conjugado com a temperatura de armazenamento e outros

factores (Davison, 1969; Moreira dos Santos, 1998). Alguns autores defendem a existência de um fotoperíodo, com alternância entre luz e escuridão (Moritz, 1987; Boersma *et al.*, 2000), aquando da eclosão das *ephippia*. Por outro lado, outros autores defendem que a iluminação contínua (Pancella e Stross, 1963; Carvalho e Wolf, 1989; Larsson, 1991; Barata *et al.*, 2000) basta para se obter a eclosão. Um outro factor de divergência é a temperatura de eclosão, alguns autores sugerem 4°C (Stross, 1966; De Meester e De Jager, 1993a; Boersma *et al.*, 2000), 12°C (Stross, 1966), ou mesmo 24°C (Stross, 1966; Davison, 1969). O meio aquoso em que a eclosão é provocada é um outro factor que também difere entre autores: Pancella e Stross (1963) e Stross (1966) são apologistas do uso de meios padronizados para a cultura de *Daphnia*, mas a água ultra-pura (Larsson, 1991) e a água do local filtrada (Stross, 1966; Mellors, 1975; Moritz, 1987; Boersma *et al.*, 2000;) são os meios mais utilizados.

### **I.2.3 - RESPOSTAS DE *DAPHNIA* A DIFERENTES NÍVEIS ALIMENTARES**

A dieta alimentar dos organismos do género *Daphnia*, à semelhança de outros cladóceros, tem sido objecto de alguns estudos. Diferentes tipos de algas (Montel e Lair, 1997), bactérias (Sanders e Porter, 1990; Wylie e Currie, 1991) e rotíferos são os principais elementos da dieta alimentar de *Daphnia* (Ryther, 1954; Montel e Lair, 1997; Repka, 1998). Estes trabalhos tentaram, de algum modo, demonstrar o tipo de resposta de *Daphnia* quando sujeita a diferentes condições alimentares. Vários autores (Montel e Lair, 1997; Repka, 1997, 1998) demonstraram que cladóceros expostos a diferentes condições alimentares alteram a taxa de crescimento populacional, a fecundidade e a sobrevivência. As respostas observadas para níveis baixos de alimentação compreendem, normalmente, um desinvestimento no esforço reprodutivo, com conseqüente decréscimo do número de neonatos por ninhada. À medida que vai aumentando a concentração de alimento, há um incremento do número de neonatos produzido (Gliwicz e Guisande, 1992; Guisande e Gliwicz, 1992; Gliwicz e Boavida, 1996), até ser atingido um limiar geneticamente pré-estabelecido (Lampert, 1978). Por outro lado, pode ser observado um efeito inibitório a elevados níveis alimentares (Ryther, 1954), possivelmente devido a algumas substâncias tóxicas produzidas pelas algas. Por outro lado, a qualidade nutritiva (Kilham *et al.*, 1997), bem

como a diversidade (Repka, 1997, 1998) das algas fornecidas tem sido objecto de estudo em experiências de ciclo de vida com cladóceros.

Recentemente, foram estudadas as respostas de diferentes clones de *Daphnia* a diferentes regimes alimentares. Conforme já referido, em ecossistemas lênticos dulçaquícolas a variabilidade clonal é de extrema importância, sendo que novas populações provenientes de reprodução sexuada poderão estar mais ou menos aptas às condições ambientais agora existentes (Hairston, 1996), incluindo baixos ou altos níveis de organismos fitoplanctónicos. Repka (1997, 1998) observou que clones provenientes de diferentes lagos respondem de diferente modo quando sujeitos a diferentes dietas alimentares. A adaptação às condições existentes no lago (Repka, 1997, 1998) ou a distribuição geográfica são factores que podem ajudar a compreender as diferentes respostas observadas (Repka, 1997).

### I.3. OBJECTIVOS

O presente trabalho pretendeu avaliar as respostas de vários clones de *D. longispina* a diferentes níveis alimentares. O objectivo central deste estudo consistiu em analisar a variabilidade clonal das respostas a elevados e reduzidos níveis de alimento, explorando possíveis diferenças entre clones provenientes directamente do campo e clones provenientes de *ephippia*, ambos isolados de duas lagoas eutróficas. A menor ou maior disponibilidade de alimento é apenas um dos vários factores de stress a que as populações naturais estão sujeitas, justificando-se o aprofundar dos estudos acerca da variabilidade das respostas dentro e entre populações de cladóceros. Para cada clone, foram analisados parâmetros de resposta como a mortalidade, o crescimento, a fecundidade e a taxa de incremento populacional. O alimento testado consistiu na alga verde *Selenastrum capricornutum*, em diversas concentrações, simulando níveis alimentares reduzidos, médios e elevados. A prossecução do presente trabalho só foi possível através do cumprimento de dois objectivos acessórios ao próprio trabalho experimental: a definição e optimização das condições de cultura dos organismos em laboratório, para manutenção contínua; o estabelecimento de um protocolo eficiente de eclosão de *ephippia*, e respectivo melhoramento, visando um melhor desempenho da metodologia.



## **II – MATERIAL E MÉTODOS**



## II - MATERIAL E MÉTODOS

### II.1. COLHEITA E MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

#### II.1.1 – LOCAIS DE COLHEITA

Os locais escolhidos para a recolha do material biológico (fêmeas de *Daphnia longispina* e de ovos de resistência - *ephippia*) foram duas lagoas situadas na Região Centro/Norte de Portugal: a Lagoa de Mira e a Lagoa da Vela (Fig. II.1).

##### **Lagoa da Vela**

A Lagoa da Vela (44°58' N, 5°18' W) está situada na freguesia de Quaios (Figueira da Fóz), estando classificada desde 1960 (Nauwerck, 1960) como eutrófica. É uma lagoa pouco profunda e com uma área máxima aproximada de 0,7 km<sup>2</sup>, distando do mar cerca de 6km. A água que entra na lagoa é proveniente de linhas de água circundantes, saindo, quando a cota o permite, através de uma vala (Vala do Zurrão).

As actividades exercidas na lagoa (ex: pesca, recreio) e nas áreas circundantes (ex: agricultura) são responsáveis pela entrada massiva de matéria orgânica e nutrientes. Os terrenos circundantes da zona Este da lagoa são aproveitados para culturas agrícolas, onde há uma forte utilização de fertilizantes e pesticidas, que ao serem lixiviados, poderão alterar a estrutura das comunidades biológicas da lagoa.

##### **Lagoa de Mira**

A Lagoa de Mira (44°77' N, 5°21' W) está situada na freguesia de Mira (Mira). É uma lagoa com uma área de aproximadamente 0,019 km<sup>2</sup>, pouco profunda, que dista do mar aproximadamente 4km. A sua origem provém de uma vala (Vala da Prevença) que entra no Concelho de Mira pelo seu lado interior-Sul.

A variedade de actividades desenvolvidas em redor da lagoa faz com que esta esteja exposta a poluição difusa (e.g. agricultura) e a poluição directa (e.g. pesca, recreio). É inegável

que toda esta pressão antropogénica acarreta efeitos negativos sobre as comunidades biológicas residentes na lagoa, sendo, todavia, a sua extensão desconhecida.

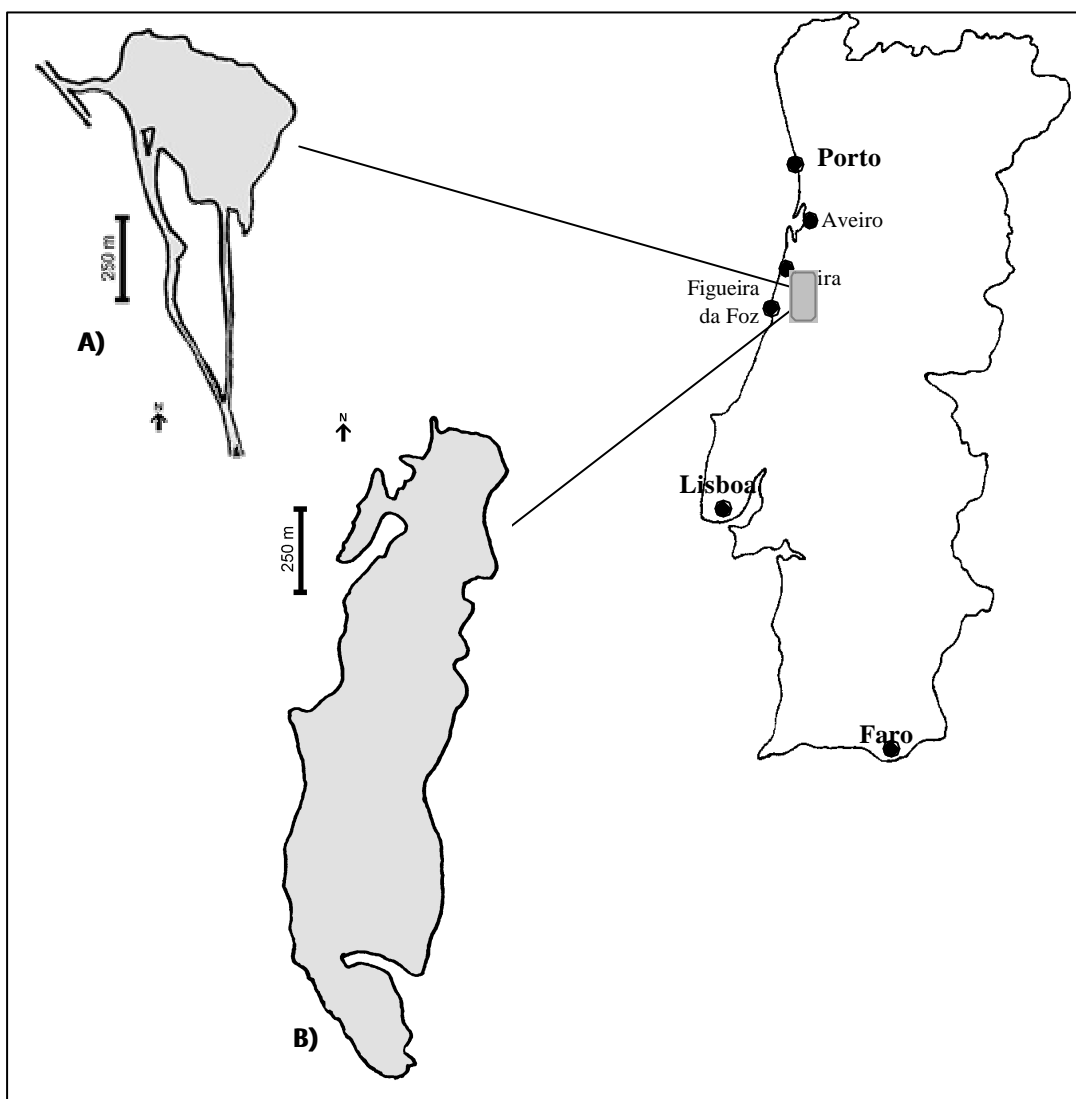


Figura II.1 – Localização das lagoas de Mira (A) e da Vela (B).

### 11.1.2 – MATERIAL BIOLÓGICO

Para a realização do presente trabalho foi escolhida a espécie de campo *D. longispina* tendo sido colhidas quatro populações. Duas delas provenientes directamente do campo para culturas individualizadas em laboratório (Fig. II.2 A): uma da Lagoa de Mira (população M) e outra da Lagoa da Vela (população V). As outras duas populações são originárias da

eclosão laboratorial de *ephippia* (Fig. II.2 B), colhidas nas mesmas lagoas (populações EM e EV).

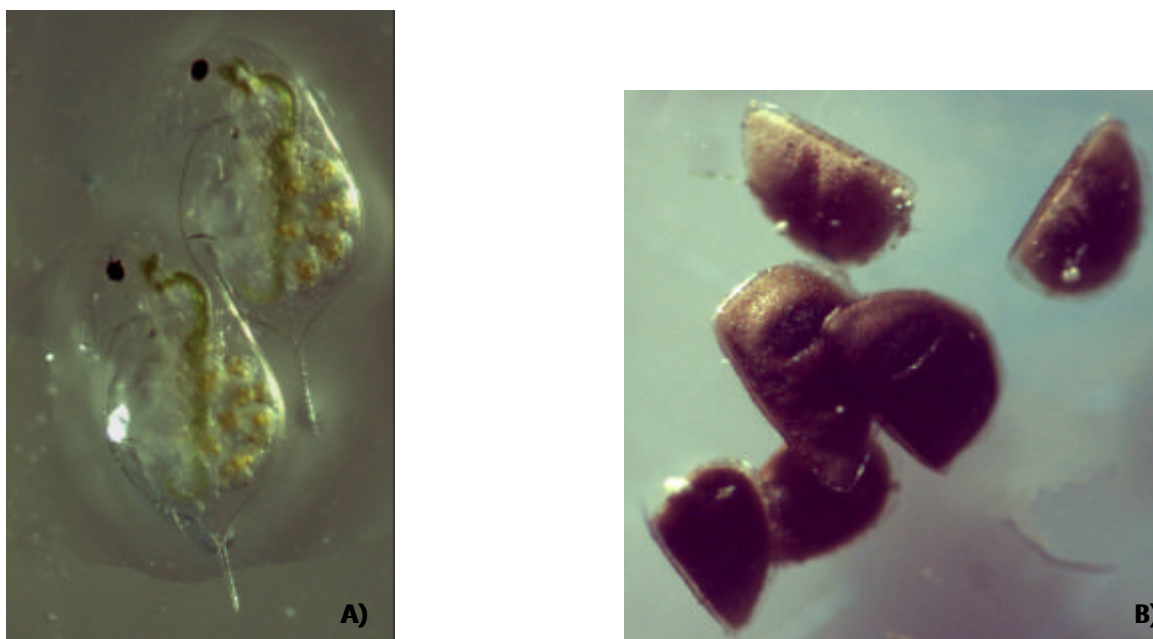


Figura II.2 – A) Adultos de *Daphnia longispina* B) *Ephippia* de *D. longispina*

### ***Isolamento de clones***

Os indivíduos provenientes directamente de campo foram colhidos com uma rede de malha de 250µm e transportados vivos para o laboratório em frascos de vidro de 1 L, contendo água do local. Para iniciar as culturas, foram escolhidas fêmeas já adultas e que apresentassem ovos ou embriões no marsúpio. Todos os espécimes foram individualizados em frascos de vidro, contendo 100ml de meio de cultura (ver abaixo). No caso das populações provenientes de *ephippia*, estas foram colhidas na margem das lagoas, junto à água e transportadas para o laboratório, onde se iniciou o processo de eclosão.

Os diferentes indivíduos, provenientes directamente de campo ou de *ephippia*, foram mantidos individualmente em frascos até à 3ª ou 4ª reprodução (ninhada). Os juvenis provenientes destas ninhadas foram colocados em culturas de grupo (6-10 indivíduos). Cada conjunto de juvenis gerados por uma mesma mãe representa um clone. A todas as progenitoras iniciais foi atribuído uma designação própria de acordo com o local (M – Mira; V – Vela) e um número aleatório; aos clones provenientes de *ephippia*, foi acrescentado um E à sua identificação. Deste modo, o clone EM6 representa todos os organismos com um genoma idêntico ao da progenitora (nº 6) inicialmente isolada da eclosão de um *ephippium*

colhido na Lagoa de Mira. As culturas dos diversos clones de *D. longispina* foram mantidas em laboratório segundo as normas de manutenção de *D. magna* (ASTM, 1980).

### ***Eclosão de ephippia***

As *ephippia* provenientes da Lagoa de Mira foram eclodidas segundo o método descrito por De Meester e De Jager (1993b), com algumas alterações. As *ephippia* foram triadas do restante material e deixadas a seco, no escuro, durante uma semana. Após este período, foram mergulhadas em meio de cultura (ver abaixo) e armazenadas a  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ , no escuro. Ao fim de aproximadamente quatro semanas registou-se a eclosão dos primeiros juvenis de *D. longispina*. Dado que este processo se revelou demorado, tentou-se uma outra técnica, aquando da recolha das *ephippia* da Lagoa da Vela, de modo a que o processo fosse mais rápido. As *ephippia* colhidas foram triadas e colocadas num copo com água da lagoa filtrada e guardadas a  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , com um fotoperíodo de  $16^{\text{L}}:8^{\text{D}}$ . Após uma semana registou-se a eclosão dos primeiros indivíduos. As técnicas aqui empregues na eclosão das *ephippia* resultaram de um cruzamento de vários métodos descritos na literatura, tendo como base principal o processo natural. As *ephippia* eram observadas diariamente e quando novos juvenis apareciam, estes eram retirados e individualizados em frascos de vidro contendo 100ml de meio de cultura (ver abaixo). Conforme efectuado para os adultos, os cladóceros obtidos por eclosão de *ephippia* foram tratados de acordo com as condições padronizadas de manutenção de *Daphnia* em laboratório (ASTM, 1980).

## **II.1.3 – MANUTENÇÃO DAS CULTURAS**

### ***Preparação do meio de cultura***

Após a obtenção e isolamento dos clones das quatro populações, estes foram mantidos em laboratório de acordo com condições padronizadas (ASTM, 1980). Para a manutenção das culturas foi usado um meio de cultura sintético, designado de “ASTM hard water” (ASTM, 1980; EPA, 1989) (adiante referido apenas como ASTM), preparado com água nanopura e com os compostos químicos apresentados na Tabela II.1. As soluções stock dos compostos químicos enumerados foram feitas com antecedência e armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  (Tab. II.1). O meio de cultura (ASTM) foi armazenado a  $20^{\circ}\text{C}$  em bidões de plástico de 20L, com

uma torneira na zona inferior para facilitar o acesso, aquando da distribuição do meio pelos recipientes de cultura.

Tabela II.1 – Composição química do meio de cultura sintético “ASTM hard water” e suas características físicas (*adaptado de ASTM, 1980*).

características físicas (adaptado de KSM, 1986).

Formúla Química	Quantidade de composto para solução stock (g/l)	Quantidade de composto para 2L de solução concentrada (g)	Volume de solução concentrada para 20L de meio de cultura (ml)
NaHCO <sub>3</sub>	19,20	38,40	200
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	24,57	49,14	200
KCl	0,80	1,60	200
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O <sup>(*)</sup>	2,40	Preparar no momento	
Tiamina HCl (B <sub>1</sub> ) Cianocobalamina (B <sub>12</sub> ) Biotina (H)	0,150/100ml 0,002/100ml 0,0015/100ml	Um microtubo com 1ml de uma mistura de vitaminas guardado no congelador	
pH = 7,8 ± 0,2			

<sup>(\*)</sup> devido à baixa solubilidade deste composto, são dissolvidas 2,4g em 1,5L de H<sub>2</sub>O nanopura, mantendo-se em agitação contínua durante o tempo necessário à sua mistura. A solução é toda utilizada na preparação do ASTM.

### **Preparação de alimento**

O alimento utilizado na dieta de *D. longispina* foi a alga verde *Selenastrum capricornutum* (recentemente reclassificado como *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (syn. *Selenastrum capricornutum*)) cultivada em sistema de crescimento contínuo em laboratório. O meio de cultura usado foi “Woods Hole MBL” (Stein, 1973) (adiante referido como MBL) (Tab. II.2). As culturas de alga foram mantidas em garrações de vidro de 10L, contendo um volume de 8L de MBL. A montagem do sistema foi feita com uma série de tubos (com 6 e 3mmØ): um tubo associado a uma pipeta de vidro para o correcto arejamento do meio; um outro com a finalidade de transferência de meio (o seu fluxo foi controlado por uma válvula); e um outro de tamanho reduzido para a saída de ar (com um pequeno filtro de gaze a obstruir a abertura) (Fig II.3). A preparação do meio MBL, bem como a sua transferência e inoculação com *S. capricornutum* foram efectuados em condições de assepsia, para evitar contaminações das culturas, tendo, também sido utilizado um filtro de 0,2µm imediatamente a seguir à bomba de ar (Fig II.3).

Tabela II.2 – Composição química do meio de cultura de *Selenastrum capricornutum* MBL (adaptado de Soares, 1989).

	Fórmula Química	Quantidade de composto para solução stock (g/l)	Volume retirado da solução stock por cada litro de meio (ml)
Macronutrientes	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,760	1
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	36,970	1
	$\text{NaHCO}_3$	12,600	1
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	8,710	1
	$\text{NaNO}_3$	85,010	1
	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	28,420	1
Micronutrientes	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	4,360	1
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3,150	1
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,001	1
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,022	1
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,010	1
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,180	1
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006	1
Vitaminas(*)	Tiamina HCl ( $\text{B}_1$ )	0,1mg/l	
	Biotina (H)	0,5mg/l	
	Cianocobalamina ( $\text{B}_{12}$ )	0,5mg/l	
	TRIS (hidroximetil aminometano) (**)	50g/200ml	2

(\*) só são adicionadas ao meio após a autoclavagem e arrefecimento

(\*\*) o pH tem de ser ajustado a 7,2 a 20°C, adicionando HCl

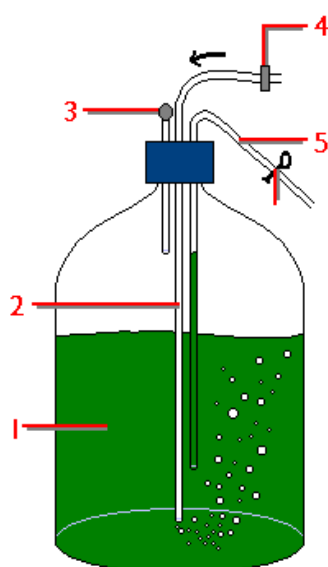


Figura II.3 – Esquema representativo do sistema de cultura da alga *Selenastrum capricornutum*. 1) Cultura de *S. capricornutum* em meio de cultura MBL; 2) Tubo de arejamento (seta assinala a entrada de ar); 3) Tubo de saída de ar protegido com uma rolha de gaze; 4) Filtro de 0,2 µm; 5) Tubo de transferência de meio.



A cultura de *S. capricornutum* foi deixada em crescimento ao longo de uma semana, atingindo o seu pico ao sétimo dia. Nesta altura, foram inoculadas novas culturas e o restante foi preparado para alimento. Para a preparação de alimento, as culturas foram centrifugadas a 10 000rpm, durante 5min. O sobrenadante (MBL) foi desprezado e o resíduo ressuspendido com ASTM. A suspensão obtida foi diluída numa proporção 1:10 (suspensão: ASTM) e lida a sua absorvância a 440nm (espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys™), utilizando-se um branco contendo ASTM. A absorvância foi então acertada para valores entre 0,400 e 0,900, possibilitando o cálculo do volume de alimento a adicionar aos frascos de cultura de *D. longispina* (ver Anexos II a V). O objectivo final foi ter uma concentração padronizada de células de *S. capricornutum* para alimentar os clones de *Daphnia*. Observações preliminares indicaram uma concentração de  $1,5 \times 10^5$  céls/ml/dia.

#### **Aditivo orgânico: extracto de algas**

Para além do alimento (*S. capricornutum*) foi igualmente adicionado ao meio de cultura um aditivo orgânico constituído por um extracto da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Baird *et al.*, 1988). Este aditivo ou extracto é preparado a partir de uma solução de reserva (Soares, 1989) da qual se retiraram 18ml para obter 2 litros de solução diluída em água nanopura. Após esta dissolução foi lida a absorvância de uma diluição a 1:10 da solução inicial a um comprimento de onda de 440nm, sendo ajustada a 0,62 de absorvância (por diluição ou concentração). Esta solução foi filtrada em vácuo com um filtro de 0,2µm de porosidade e 50mm de diâmetro (Schleicher & Schuell™, ME 24/21 ST) com o objectivo de retirar todas as impurezas e microorganismos. Quer a solução inicial, quer as alíquotas de extracto filtrado foram armazenadas a 4°C, em recipientes envoltos em papel de alumínio para evitar a fotodegradação. O volume de extracto foi adicionado ao meio de cultura de acordo com a tabela do Anexo I.

Tabela II.3 – Composição química do extracto da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e quantidades relativas na forma de pó seco (*adaptado de Soares, 1989*).

Matéria seca	92 - 95 %
Matéria orgânica	50 - 55 %
Matéria inorgânica	40 - 45 %
Nitrogénio	1,40%
Fósforo	0,05%
Potássio	2,50%
Cálcio	1,20%
Magnésio	0,80%
Enxofre	3,70%
Cloro	4,00%
Alumínio	5,0ppm
Boro	82,0ppm
Cobalto	1,6ppm
Cobre	5,0ppm
Ferro	3000,0ppm
Iodo	1800,0ppm
Manganésio	12,0ppm
Níquel	5,0ppm
Vanádio	0,7ppm
Zinco	100,0ppm
Citoquininas e outras hormonas promotoras de crescimento	130 - 260ppm

### **Manutenção da cultura de *Daphnia longispina***

Enquanto não foram realizados testes, os organismos foram mantidos em culturas de grupo de 6-10 indivíduos, em frascos de 100 ml. Antes do início de um teste, as culturas de clones foram transferidas para frascos de 800ml para garantir um número suficiente de neonatos para a realização do teste. Nestes frascos foram colocados aproximadamente 30 organismos, mais do que o padronizado para a *D. magna*, uma vez que o tamanho da espécie em estudo é mais reduzido. A renovação do meio de cultura foi feita de 2 em 2 dias através da transferência dos organismos para recipientes contendo ASTM, alimento (*S. capricornutum* -  $1,5 \times 10^5$  céls/ml/dia) e extracto frescos, à semelhança do que se encontra descrito para *D. magna* (ASTM, 1980), sendo prática corrente no laboratório. Devido ao reduzido tamanho desta espécie, comparativamente a *D. magna*, a adição de alimento não foi feita diariamente mas só aquando da renovação do meio de cultura. As culturas foram armazenadas em câmaras climáticas (Modelo F10000 EDTU) com temperatura controlada ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e sujeitas a um fotoperíodo de  $16^{\text{L}}:8^{\text{D}}$ . Todos os frascos foram devidamente

etiquetados referindo a população e respectivo clone, sua data de nascimento e datas de nascimento das ninhadas. Aquando do nascimento da terceira ninhada de um dado clone, estes juvenis foram isolados num novo recipiente com meio de cultura fresco, dando início a uma nova cultura (renovação da cultura). As mães foram guardadas durante algum tempo, até haver garantias de que as novas “recrutas” as substituíram com sucesso.

## II.2. TESTES DE ALIMENTAÇÃO

### II.2.1 - PREPARAÇÃO E EXECUÇÃO DO TESTE

Na prossecução do presente trabalho foram realizados testes crónicos de 21 dias seguindo as normas básicas para a sua execução (EPA, 1989). As concentrações\* de alimento abrangeram uma vasta gama de valores, desde a ausência de alimento ( $0,0 \times 10^5$  céls/ml/dia), passando por valores padronizados ( $1,5 \times 10^5$  céls/ml/dia) até valores que procuravam simular situações de “bloom” algal de um meio aquático ( $3,0 \times 10^5$  céls/ml/dia). Em cada teste foram utilizados 50 neonatos (com idade inferior a 24 horas), retirados de culturas-mãe individualizadas e mantidas em laboratório pelo menos há 20 gerações (Soares, 1989). Os indivíduos utilizados eram neonatos nascidos entre a terceira (N3) e a quinta (N5) ninhadas. A utilização de ninhadas intermédias é justificada para garantir uma boa condição dos neonatos (nem muito fracos – primeiras ninhadas, nem muito velhos – últimas ninhadas). Cada tratamento (concentração de *S. capricornutum*) consistiu em dez organismos individualizados por 10 frascos. Os frascos de teste continham 50 ml de ASTM, extracto de algas e a dose alimentar pretendida. Os testes foram efectuados com 3 clones de campo e 3 clones provenientes de *ephippia* de cada população (Mira e Vela), com excepção da população EV, onde só foram utilizados 2 clones devido à elevada mortalidade pós-eclosão registada. Relativamente à população M, um dos clones teve de ser excluído devido à elevada mortalidade registada no controlo. As condições em que os testes foram realizados seguiram os mesmos requisitos que se observaram ao longo da manutenção das culturas ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $16 \text{ L:8 D}$ ) sem arejamento. O meio de cultura e alimento foram renovados de 2 em 2 dias.

---

\* uma alternativa seria utilizar a designação densidade, por oposição a concentração, já que os dados são expressos em número de células/ml; todavia, esta última designação foi utilizada, à semelhança de outros autores.

## II.2.2 - PARÂMETROS BIOLÓGICOS

Os organismos foram observados diariamente, procedendo-se à contagem e remoção dos mortos, se necessário, bem como ao registo da ocorrência de ninhadas. Aquando da renovação de meio, foram igualmente retiradas as *exuviae* dos organismos de teste, caso estivessem presentes. No decurso dos testes, foram registados os seguintes parâmetros: mortalidade, crescimento dos organismos de teste (mães), idade à primeira reprodução, número de neonatos por ninhada, comprimento médio e biomassa média dos neonatos e número de ninhadas por organismo teste (Glazier, 1998). Alguns destes parâmetros foram medidos após a conclusão do teste, tal como a biomassa das ninhadas e das mães. Todos os dados foram registados em tabelas criadas para o efeito (ver Anexo VI).

O crescimento das mães foi determinado de forma contínua, ao longo de todo o teste, a partir da medição do comprimento do 1º exopódito da 2ª antena da *exuvia*, com a ajuda de uma ocular micrométrica calibrada (Lupa Olympus SZX9), (ver Figura II.4). A partir deste parâmetro é possível prever o comprimento do corpo de *D. longispina*, com base na relação alométrica obtida para estas duas variáveis. A recta de regressão foi determinada por Silva (1999) através da medição de 1806 indivíduos de *D. longispina* recolhidos na Lagoa das Braças (Quaias, Figueira da Foz):

$$y = 10,5x - 0,1437 \text{ (} r^2 = 0,9621 \text{)}.$$

Ao fim do 9º-11º dia foi registado o nascimento das primeiras ninhadas. Nas primeiras horas (<24 horas) subsequentes ao seu nascimento, eram contados os neonatos de cada ninhada. A determinação do comprimento médio dos neonatos foi feita com base na média aritmética do comprimento de 3 neonatos escolhidos aleatoriamente. Esta medição foi realizada com o auxílio de um estereomicroscópio usando uma ocular micrométrica calibrada (Lupa Olympus SZX9), onde o neonato foi medido desde o topo da cabeça à base do espinho caudal (Figura II.5). Todos os neonatos foram retirados do frasco de teste e guardados em pequenas taças de alumínio previamente taradas. Seguidamente, estas taças foram guardadas em microtubos numerados e congelados a -80°C, para posterior determinação da biomassa total da ninhada. Posteriormente, os microtubos

(congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), contendo as amostras, foram liofilizados (liofilizador Flexy-Dry™, com bomba de vácuo CRVP-127D) à temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$  e a 50mtorr de pressão, durante aproximadamente 14 horas. No dia seguinte, os microtubos foram retirados para um excicador e procedeu-se à pesagem (Micro-balança Mettler UMT 2) do material biológico liofilizado. A biomassa média dos neonatos foi determinada pelo quociente entre a biomassa total da ninhada e o número de neonatos da ninhada.

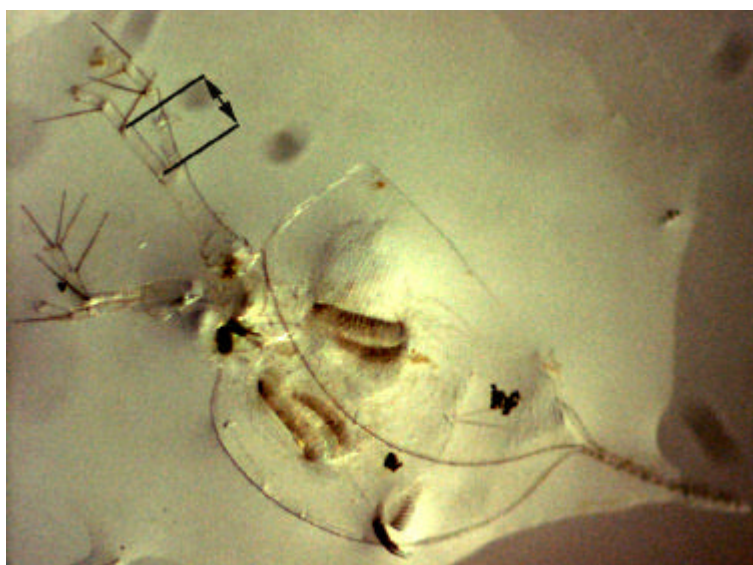


Figura II.4 – Imagem representativa do modo de medição do 1º exopódito da 2ª antena numa *exuviae* de *D. longispina*.

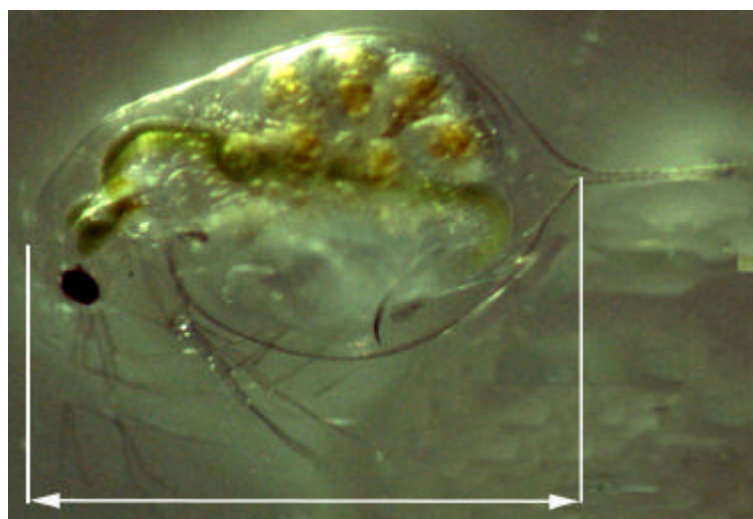


Figura II.5 – Esquema exemplificativo do método de medição do corpo de *Daphnia longispina*, desde o topo da cabeça até à base do espinho caudal.

Ao fim dos 21 dias de teste, os organismos de teste (“mães”) foram todos medidos, segundo o processo já descrito (Figura II.5), tendo sido individualmente processados para determinação da sua biomassa, conforme descrito para os juvenis. O número de ninhadas de cada indivíduo, ao longo do período de 21, dias foi igualmente registado.

A taxa de crescimento diário foi calculada através do tamanho do corpo no início e final do teste, medido como referido anteriormente. Para o cálculo dessa taxa foi utilizada a seguinte expressão:

$$\text{Taxa de crescimento diário} = \frac{\ln(I_f) - \ln(I_i)}{\Delta t},$$

em que:  $I_f$  é o tamanho do organismo no fim do teste (em mm),  $I_i$  é o tamanho do corpo do organismo no início do teste (em mm) e  $\Delta t$  é o intervalo de tempo (em dias). Esta taxa de crescimento é expressa em dias<sup>-1</sup> (Sobral, 1997; Burns, 2000).

As estimativas de sobrevivência e fecundidade foram também utilizadas na computação da taxa de incremento populacional ( $r$  ou  $r_s$ ). Este parâmetro demográfico foi determinado iterativamente pela equação Euler-Lotka:

$$1 = \sum_{x=0}^n e^{-rx} l_x m_x,$$

em que:  $r$  é a taxa de incremento populacional (dia<sup>-1</sup>),  $x$  é a classe de idade em dias ( $x=0, 1, 2, \dots, n=21$ ),  $l_x$  é a probabilidade de sobrevivência à idade  $x$  e  $m_x$  é a fecundidade na idade  $x$ . Para determinar a variabilidade associada a  $r$  foi utilizado o método Jackknife (Meyer *et al.*, 1986). Para estimar o  $r$ , só foram considerados os dados relativos à idade e fecundidade até ao 15º dia, na generalidade é assumido que os dados até à terceira ninhada são suficientes (Lürling e Van Donk, 1997; Boersma *et al.*, 1999).

## **II.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados relativos à mortalidade, para cada clone, em cada tratamento, foram comparados usando o teste exacto de Fisher (EPA, 1989). Para as variáveis globais como a idade à primeira reprodução, número total de neonatos, biomassa total das ninhadas, número de ninhadas, taxa de crescimento diário e taxa de incremento populacional foi empregue uma análise de variância bifactorial para avaliar as diferenças entre os clones, bem como entre as diferentes concentrações de alimento, e sua interacção. Nos parâmetros: número total de neonatos, biomassa total das ninhadas, número de ninhadas e taxa de crescimento diário, o clone V8 foi retirado da análise bifactorial devido à total mortalidade que se observou na concentração mais elevada. Seguidamente, foram também utilizadas análises de variância unifactoriais para testar a significância das respostas individuais de cada um dos clones às diferentes concentrações alimentares. Este procedimento foi adoptado para as variáveis globais acima mencionadas tal como para todas as variáveis parciais obtidas para cada clone (número de neonatos em cada ninhada, biomassa média de cada neonato e comprimento médio do corpo dos neonatos em cada ninhada). Caso se tenham detectado diferenças entre as concentrações alimentares foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey (HSD) (Zar, 1996). De modo a observar a similaridade de respostas dos vários clones às diferentes concentrações alimentares, foi realizada uma análise multivariável de classificação hierárquica (UPGMA, correlação de Pearson) (Legendre e Legendre, 1979). Para tal, integraram-se os valores médios dos parâmetros globais (excepto a idade à primeira reprodução e a taxa de incremento populacional).

### **III – RESULTADOS**





### III – RESULTADOS

#### III.1 – Mortalidade

A Tabela III.1.1 apresenta a percentagem de mortalidade observada ao fim dos 21 dias de ensaio. Certos clones (e.g. V5, V8 e M5) revelaram elevados valores de mortalidade em alguns tratamentos, mas na generalidade foram registados baixos valores de mortalidade. Na maioria dos clones, os níveis mais altos de mortalidade foram observados na concentração de 0,00 céls/ml/dia (sem alimento). Contudo, nos clones V5, V8 e M5 foi também observada elevada mortalidade para a concentração máxima de *S. capricornutum* ( $3,0 \times 10^5$  céls/ml/dia). Assim, em alguns casos, parece evidente uma clara tendência para que os extremos das concentrações alimentares (0,00 e  $3,0 \times 10^5$  céls/ml/dia) estejam associados a elevadas percentagens de mortalidade.

Tabela III.1.1 - Mortalidade (em percentagem) observada ao fim de 21 dias de exposição de *Daphnia longispina* a diferentes concentrações alimentares. As diferentes letras (a,b) representam as diferenças significativas entre as concentrações (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

CLONE	Concentração de <i>Selenastrum capricornutum</i> (céls/ml/dia)				
	0,00x10 <sup>5</sup>	0,75x10 <sup>5</sup>	1,50x10 <sup>5</sup>	2,25x10 <sup>5</sup>	3,00x10 <sup>5</sup>
<b>EV6</b>	20,0 <sup>a</sup>	28,6 <sup>a</sup>	11,1 <sup>a</sup>	11,1 <sup>a</sup>	12,5 <sup>a</sup>
<b>EV20</b>	70,0 <sup>b</sup>	00,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	10,0 <sup>ab</sup>	20,0 <sup>ab</sup>
<b>V3</b>	30,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	22,2 <sup>a</sup>
<b>V5</b>	33,3 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	50,0 <sup>a</sup>	22,2 <sup>a</sup>	62,5 <sup>a</sup>
<b>V8</b>	20,0 <sup>ab</sup>	00,0 <sup>a</sup>	40,0 <sup>ab</sup>	40,0 <sup>ab</sup>	100,0 <sup>b</sup>
<b>EM1</b>	20,0 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>	40,0 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>
<b>EM6</b>	80,0 <sup>b</sup>	00,0 <sup>a</sup>	10,0 <sup>ab</sup>	00,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>
<b>EM7</b>	50,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>
<b>M1</b>	30,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	20,0 <sup>a</sup>	00,0 <sup>a</sup>	10,0 <sup>a</sup>
<b>M5</b>	70,0 <sup>a</sup>	20,0 <sup>a</sup>	40,0 <sup>a</sup>	70,0 <sup>a</sup>	80,0 <sup>a</sup>

## III.2 – PARÂMETROS PARCIAIS DAS NINHADAS

### III.2.1 - Número de neonatos por ninhada

As figuras seguintes Figura III.2.1.1 e III.2.1.2 apresentam o número de neonatos em cada ninhada, para cada clone. Verificou-se que para qualquer clone o número de neonatos na concentração de 0,00 céls/ml/dia é bastante reduzido, limitando-se apenas a uma ninhada (clones EV6 e EV20) e nunca excedendo duas ninhadas (clones V3, V5 e V8). Numa observação geral é bem visível o padrão de aumento do número de neonatos à medida que as fêmeas envelhecem, em todos os clones. No entanto, esta tendência parece não ser tão pronunciada nos clones provenientes de campo (V3, V5 e V8). Parece também ser visível uma tendência gradual para um aumento do número de neonatos à medida que se aumenta a concentração de alimento. Foi observada a existência de uma sexta ninhada no clone EV20, na concentração de  $1,50 \times 10^5$  céls/ml/dia, e no clone V5, para a concentração de  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia. Note-se que, para o clone V8, não ocorreu a produção de neonatos na concentração mais elevada ( $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia) o que é coerente com a elevada mortalidade que este clone apresentou para a concentração em causa (ver Tabela III.1). Encontraram-se diferenças significativas no número de neonatos produzidos em relação à concentração de alimento fornecida. Relativamente ao clone EV6, a análise revelou diferenças para a ninhada N1 ( $F=8,7$ ; g.l=4, 26;  $P=0,000141$ ) e N3 ( $F=3,5$ ; g.l=3, 22;  $P=0,032$ ). O mesmo se observou para o clone EV20 nas mesmas ninhadas, para N1 ( $F=6,2$ ; g.l=4, 33;  $P=0,001$ ) e N3 ( $F=2,9$ ; g.l=3, 31;  $P=0,048$ ). No clone V3, foram encontradas diferenças significativas na ninhada N1 ( $F=76,6$ ; g.l=4, 38;  $P=1,15 \times 10^{-17}$ ) e na ninhada N2 ( $F=10,0$ ; g.l=4, 33;  $P=2,09 \times 10^{-05}$ ). No clone V5, foram também observadas diferenças nas ninhadas N1 ( $F=23,2$ ; g.l=4, 16;  $P=1,7 \times 10^{-06}$ ) e N2 ( $F=7,8$ ; g.l=4, 16;  $P=0,001$ ). O clone V8 apresentou diferenças significativas para as duas primeiras ninhadas, N1 ( $F=176,9$ ; g.l=3, 26;  $P=2,06 \times 10^{-17}$ ) e N2 ( $F=20,0$ ; g.l=3, 21;  $P=5,14 \times 10^{-06}$ ).

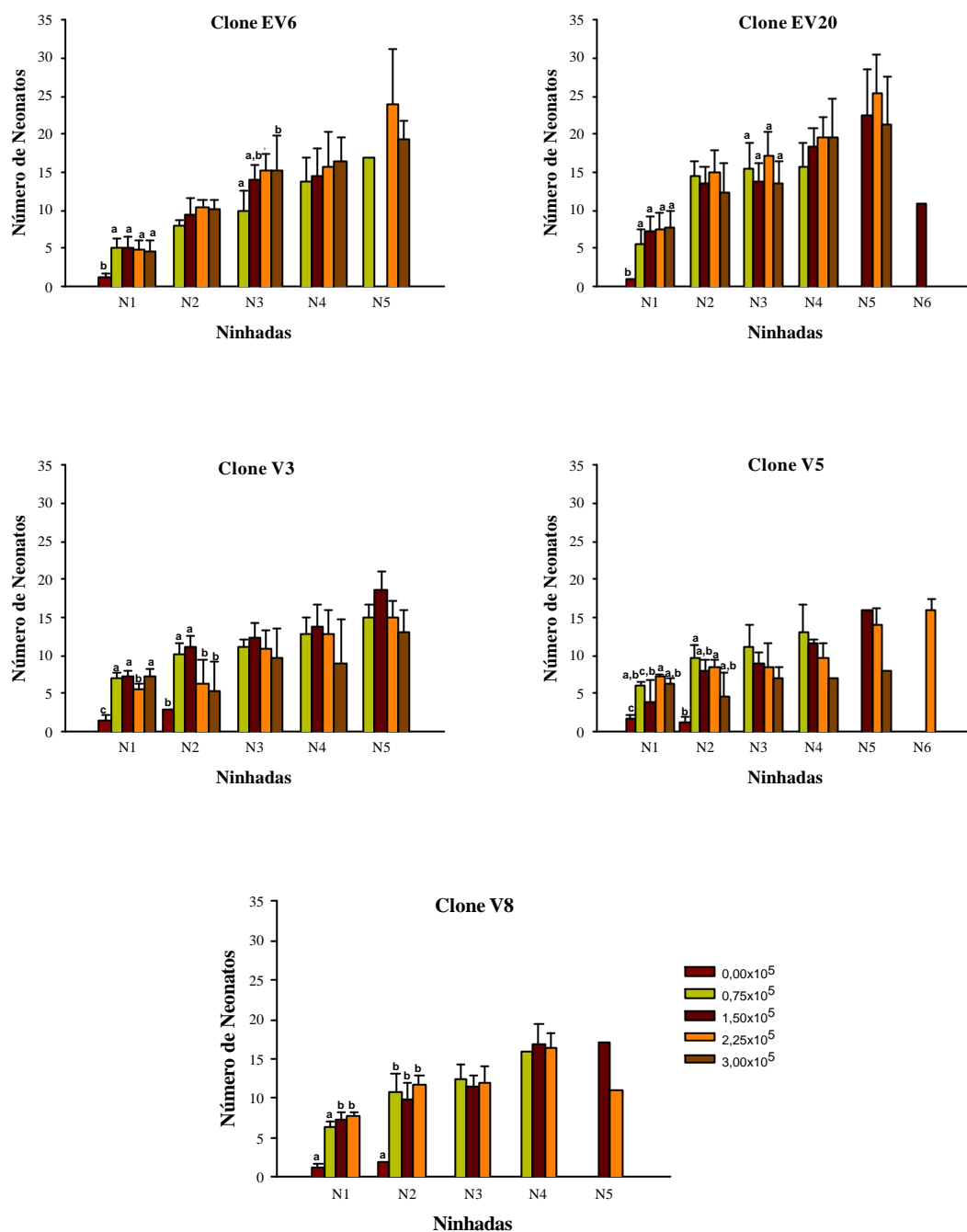


Figura III.2.1.1 – Número médio de neonatos por fêmea registado em cada ninhada, para os clones EV6, EV20, V3, V5 e V8. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

Regra geral, os clones provenientes da lagoa de Mira (Figura III.2.1.2) apresentaram um menor número de neonatos quando comparados com os clones vindos da lagoa da Vela. No entanto, demonstraram um padrão idêntico: aumento do número de neonatos da 1ª à última ninhada, assim como ao longo da crescente concentração de alimento. Na ausência de alimento (0,00 céls/ml/dia) observou-se, mais uma vez, a reduzida ou mesmo nula (EM6 e EM7) produção de neonatos e nunca ultrapassando uma ninhada. É também de salientar o discrepante aumento do número de neonatos na concentração de  $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia, relativamente às outras, no clone M5. No clone EM1 foram observadas diferenças significativas nas duas primeiras ninhadas, N1 ( $F=6,7$ ;  $g.l=4$ , 30;  $P=0,001$ ) e N2 ( $F=4,8$ ;  $g.l=3$ , 29;  $P=0,008$ ). Para o clone EM6, as ninhadas N2 ( $F=11,4$ ;  $g.l=3$ , 35;  $P=2,28 \times 10^{-05}$ ) e N4 ( $F=8,0$ ;  $g.l=3$ , 33;  $P=0,000383$ ) foram as únicas que registaram diferenças significativas na produção de neonatos entre diferentes níveis alimentares. No clone EM7, a análise revelou que para todas as ninhadas houve diferenças significativas na produção de neonatos relativamente à concentração alimentar (N1:  $F=10,7$ ;  $g.l=3$ , 36;  $P=3,56 \times 10^{-05}$ ; N2:  $F=39,8$ ;  $g.l=3$ , 36;  $P=1,61 \times 10^{-11}$ ; N3:  $F=17,0$ ;  $g.l=3$ , 36;  $P=4,88 \times 10^{-07}$ ; N4:  $F=21,4$ ;  $g.l=3$ , 34;  $P=5,85 \times 10^{-08}$ ). Em relação aos clones provenientes de campo, M1 e M5, foram observadas diferenças significativas no número de neonatos produzidos nos vários níveis alimentares. O clone M1 revelou diferenças na N1 ( $F=3,7$ ;  $g.l=4$ , 34;  $P=0,013$ ) e na N2 ( $F=4,6$ ;  $g.l=3$ , 33;  $P=0,009$ ). No clone M5, detectaram-se diferenças significativas em três ninhadas: na N2 ( $F=8,3$ ;  $g.l=3$ , 14;  $P=0,002$ ), na N3 ( $F=5,5$ ;  $g.l=3$ , 10;  $P=0,018$ ) e na N4 ( $F=6,2$ ;  $g.l=2$ , 5;  $P=0,044$ ).

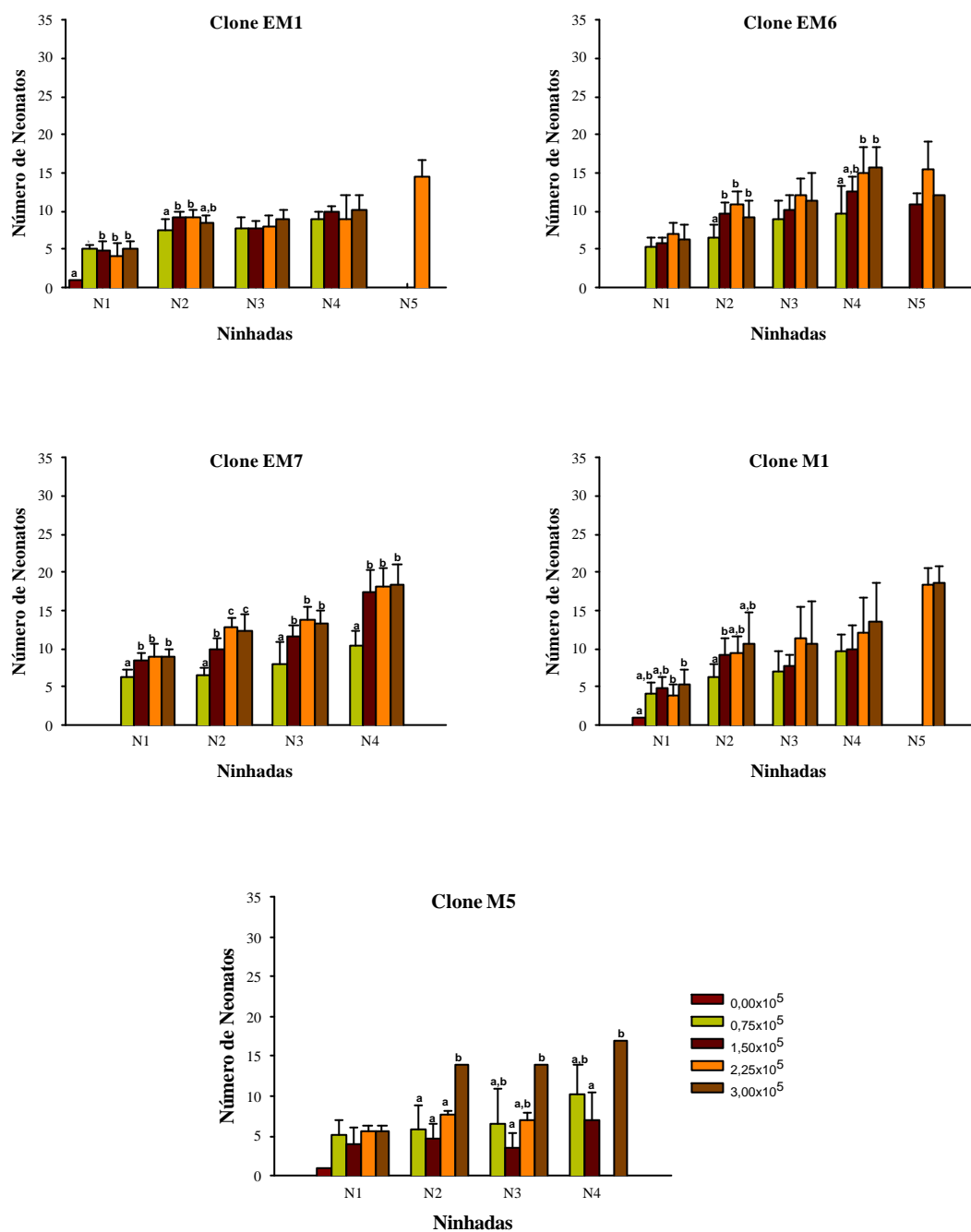


Figura III.2.1.2 – Número médio de neonatos por fêmea registado em cada ninhada, para os clones EM1, EM6, EM7, M1 e M5. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

### **III.2.2 – Biomassa média de neonatos**

Regra geral, observou-se que as biomassas médias dos neonatos para a concentração de 0,00 céls/ml/dia foi superior à das outras concentrações (Figura III.2..2.1). Para o clone EV20, na concentração de  $0,75 \times 10^5$  céls/ml/dia, foram observados neonatos com biomassa mais elevada, porém o elevado desvio padrão não permitiu encontrar diferenças significativas. Nos restantes clones ehippiais, (EV6 e EV20) não foram registadas quaisquer diferenças entre as biomassas médias dos neonatos relativamente às diferentes concentrações de alimento testadas. Relativamente aos clones de campo (V3, V5 e V8), o padrão foi semelhante ao registado para os clones ehippiais. No entanto, para o clone V8 foram registadas diferenças significativas para a primeira ninhada N1 ( $F=7,2$ ;  $g.l=3, 26$ ;  $P=0,001$ ). É de salientar os elevados desvios padrão que este parâmetro apresentou, o que dificultou a observação de diferenças entre as biomassas médias dos neonatos nos clones nas várias concentrações alimentares.

Os resultados referentes aos clones de Mira (Figura III.2.2.2) revelaram ser mais ou menos semelhantes ao padrão de resposta dos clones vindos da lagoa da Vela, não se registando diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações alimentares em quase todas as ninhadas. Todavia, o clone EM1 demonstrou alguma tendência de redução da biomassa média dos neonatos nas concentrações alimentares mais altas, tendo N2 apresentado diferenças significativas ( $F=4,3$ ;  $g.l=3, 29$ ;  $P=0,012$ ). No clone EM6, a concentração de  $0,75 \times 10^5$  céls/ml/dia revelou ser a que deu origem a neonatos com maior biomassa, na maioria das ninhadas. Os clones de campo também não revelaram diferenças significativas, com exceção de N1 do clone M5 ( $F=5,4$ ;  $g.l=4, 14$ ;  $P=0,008$ ). Na generalidade, o clone M5 apresentou biomassas ligeiramente superiores aos observados pelos outros clones.

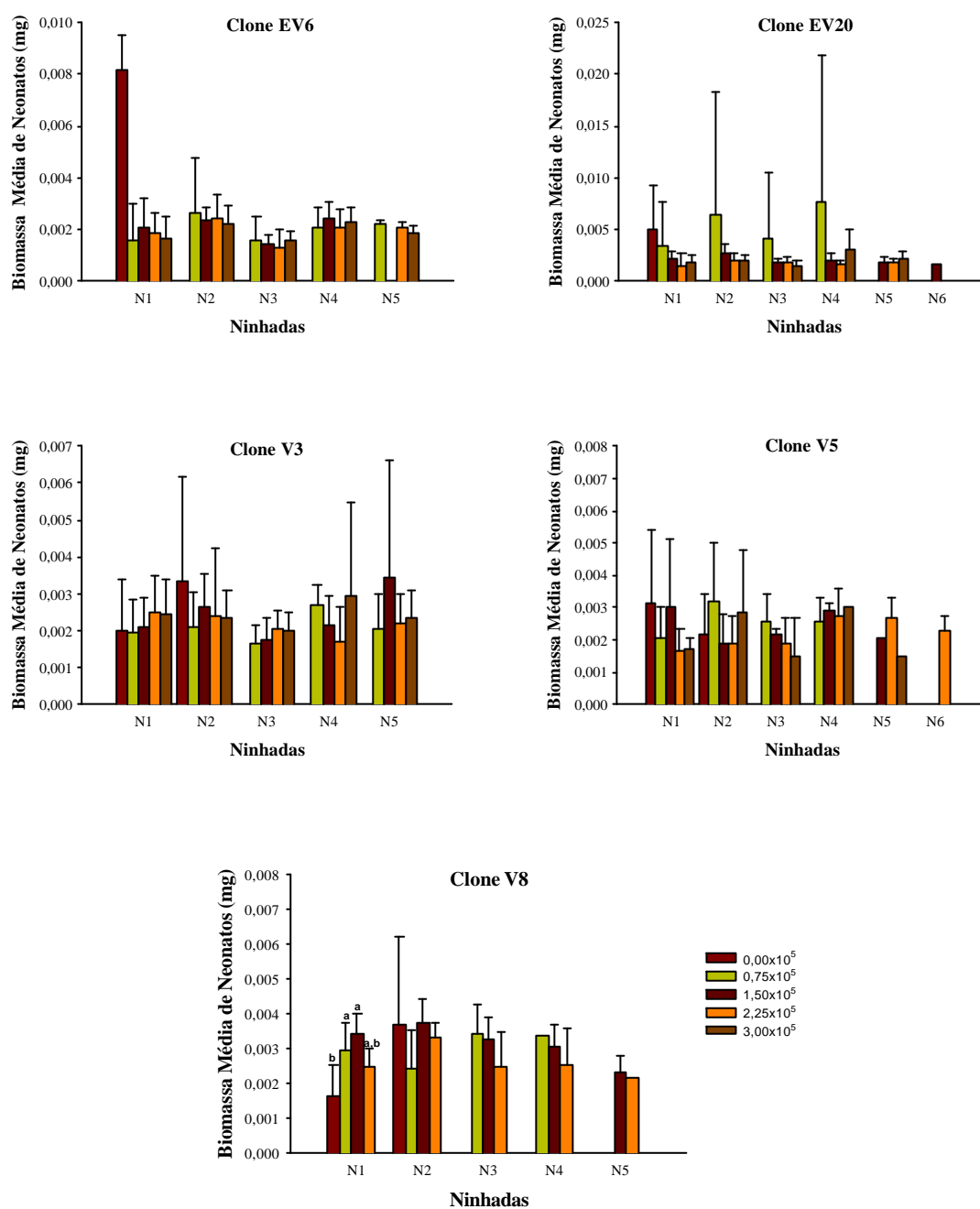


Figura III.2.2.1 – Biomassa média de neonatos (mg) produzidos em cada ninhada, para os clones EV6, EV20, V3, V5 e V8. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.



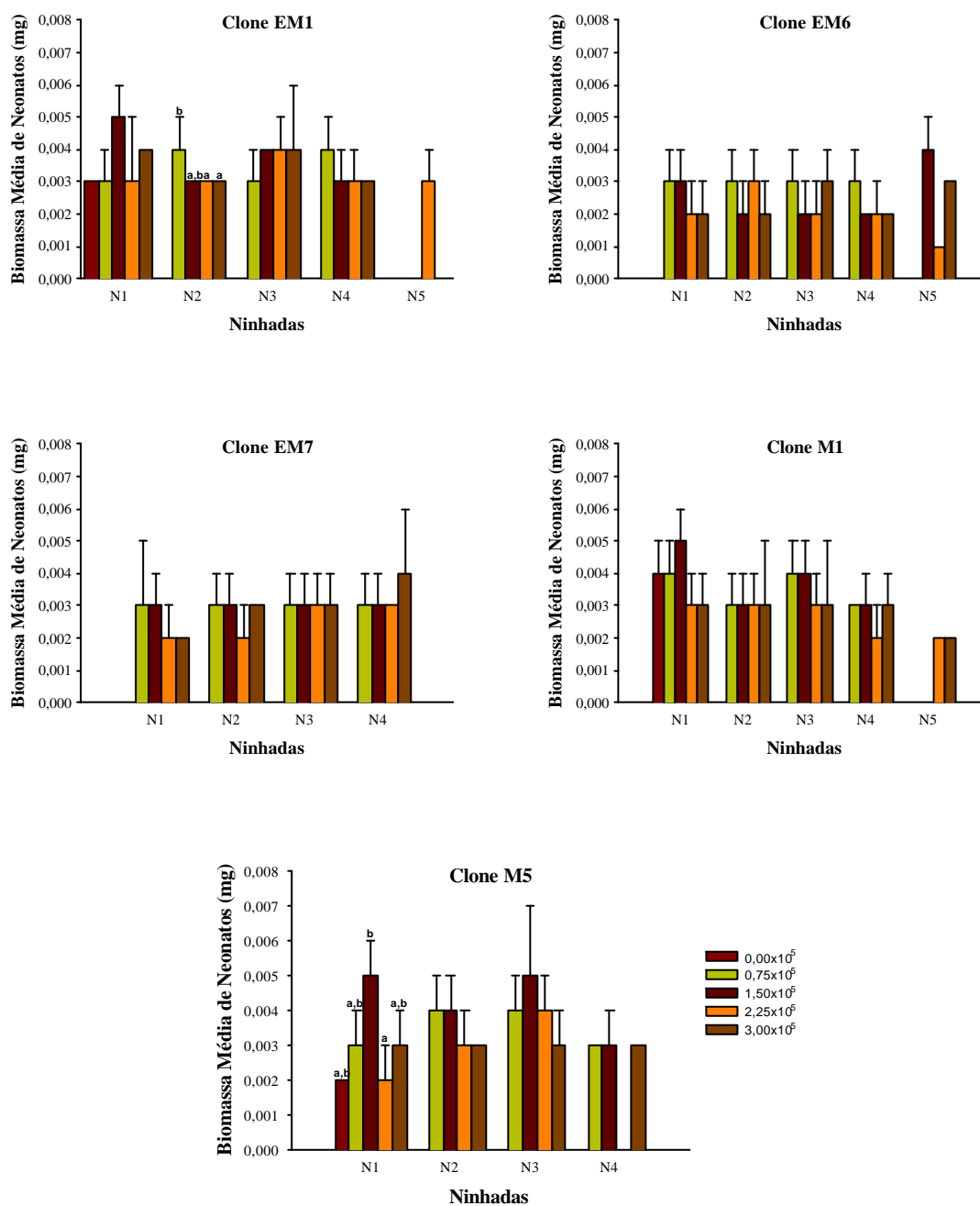


Figura III.2.2.2 – Biomassa média de neonatos (mg) produzidos em cada ninhada, para os clones EM1, EM6, EM7, M1 e M5. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

### III.2.3 – Comprimento médio dos neonatos

Os dados respeitantes ao comprimento médio do corpo dos neonatos, para os diferentes clones, encontram-se ilustrados nas Figuras III.2.3.1 (clones da lagoa da Vela) e III.2.3.2 (clones da lagoa de Mira). Para a concentração de 0,00 céls/ml/dia (ausência de alimento) foram registados valores do comprimento dos neonatos sempre mais baixos, para qualquer clone. Os clones ephippiais provenientes da lagoa da Vela (EV6 e EV20) revelaram que a concentração de  $0,75 \times 10^5$  céls/ml/dia foi a que produziu neonatos de maior porte na ninhada N2. A análise estatística revelou que o clone EV6 apresentou diferenças nas ninhadas: N2 ( $F=4,5$ ;  $g.l=3, 22$ ;  $P=0,013$ ), N4 ( $F=4,0$ ;  $g.l=3, 22$ ;  $P=0,021$ ) e N5 ( $F=8,7$ ;  $g.l=2, 4$ ;  $P=0,035$ ). Para o clone EV20 essas diferenças foram registadas na ninhada N1 ( $F=2,7$ ;  $g.l=4, 33$ ;  $P=0,049$ ), N2 ( $F=4,8$ ;  $g.l=3, 31$ ;  $P=0,008$ ) e N4 ( $F=4,5$ ;  $g.l=3, 29$ ;  $P=0,010$ ). No que respeita aos clones provenientes directamente do campo, para o clone V3 a análise revelou diferenças em duas ninhadas: N3 ( $F=7,8$ ;  $g.l=3, 32$ ;  $P=0,000491$ ) e N4 ( $F=3,9$ ;  $g.l=3, 32$ ;  $P=0,017$ ). Relativamente ao clone V5, apenas na ninhada N3 ( $F=5,6$ ;  $g.l=3, 13$ ;  $P=0,011$ ) se obtiveram diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares. De um modo geral, o comprimento dos neonatos produzidos nas ninhadas do clone V8 apresentou um valor superior ao dos restantes clones. Estatisticamente, neste clone (V8), só as três primeiras ninhadas apresentaram diferenças significativas no comprimento médio dos neonatos entre os vários tratamentos: N1 ( $F=23,3$ ;  $g.l=3, 26$ ;  $P=1,57 \times 10^{-07}$ ), N2 ( $F=37,5$ ;  $g.l=3, 21$ ;  $P=1,3 \times 10^{-08}$ ) e N3 ( $F=3,8$ ;  $g.l=2, 18$ ;  $P=0,041$ ).

Na Figura III.2.3.2 é visível a uniformidade do comprimento médio do corpo dos neonatos dos vários clones. Os clones ephippiais, principalmente o clone EM6, revelaram que as diferentes concentrações alimentares não foram responsáveis pela alteração de tamanho dos neonatos produzidos. Para o clone de campo M1, foi possível observar diferenças significativas nas três primeiras ninhadas (N1:  $F=16,8$ ;  $g.l=4, 34$ ;  $P=1,12 \times 10^{-07}$ , N2:  $F=6,0$ ;  $g.l=3, 33$ ;  $P=0,002$  e N3:  $F=3,7$ ;  $g.l=3, 33$ ;  $P=0,021$ ), com uma aparente redução no tamanho dos neonatos produzidos na concentração mais elevada. Relativamente ao clone M5, não foram registadas diferenças significativas entre o tamanho dos neonatos nos vários níveis alimentares ao longo das ninhadas produzidas. A análise estatística revelou que existem diferenças significativas no comprimento médio do corpo dos neonatos relativamente à concentração de alimento, nos clones EM1, EM7 e M1. Para o clone EM1 essas diferenças

foram apenas registadas na ninhada N4 ( $F=4,7$ ;  $g,l=3, 27$ ;  $P=0,009$ ). Já no clone EM7 observaram-se diferenças em duas ninhadas, N1 ( $F=6,0$ ;  $g,l=3, 36$ ;  $P=0,002$ ) e N2 ( $F=4,3$ ;  $g,l=3, 36$ ;  $P=0,011$ ).

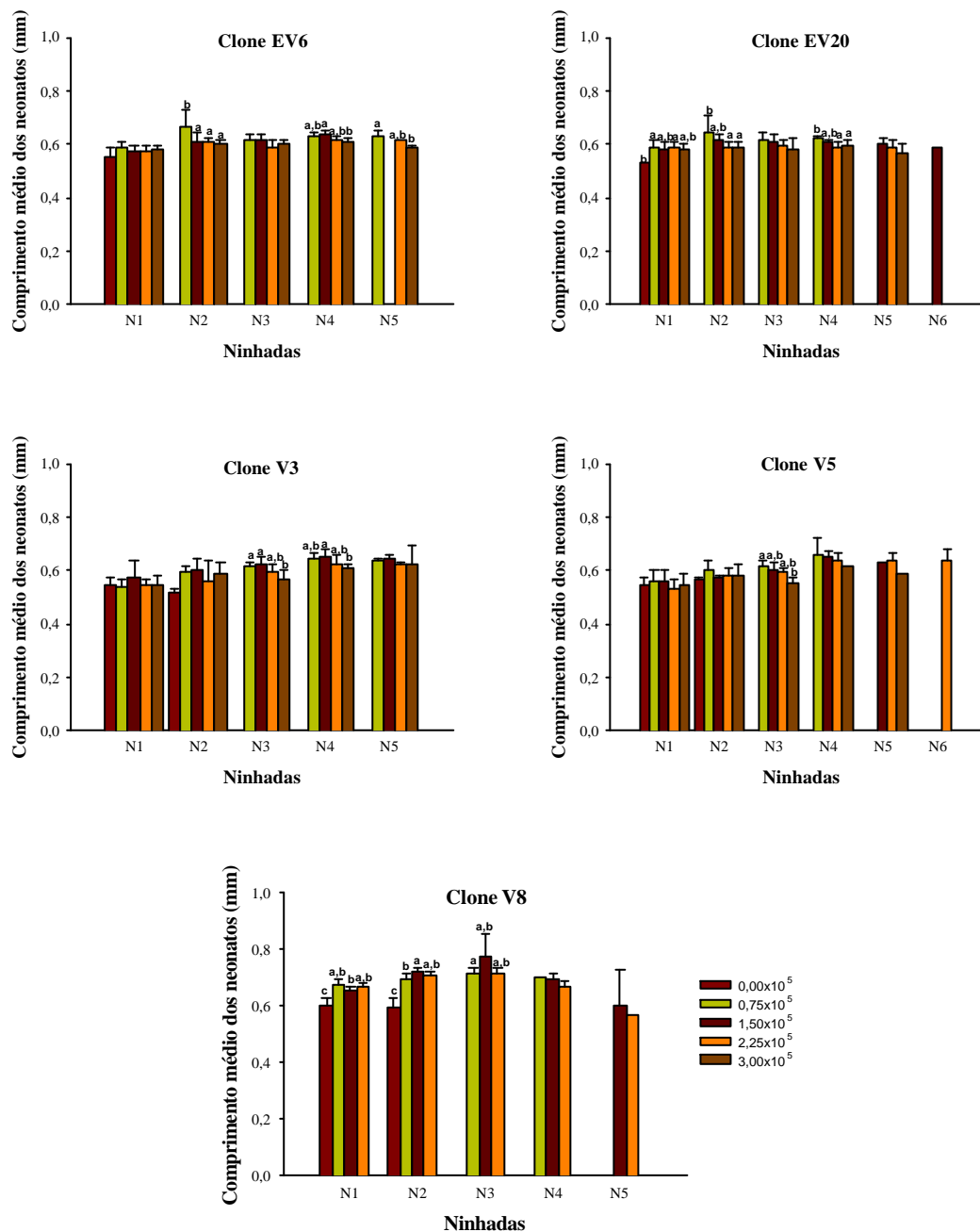


Figura III.2.3.1 – Comprimento médio dos neonatos (mm) produzidos em cada ninhada para os clones EV6, EV20, V3, V5 e V8. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

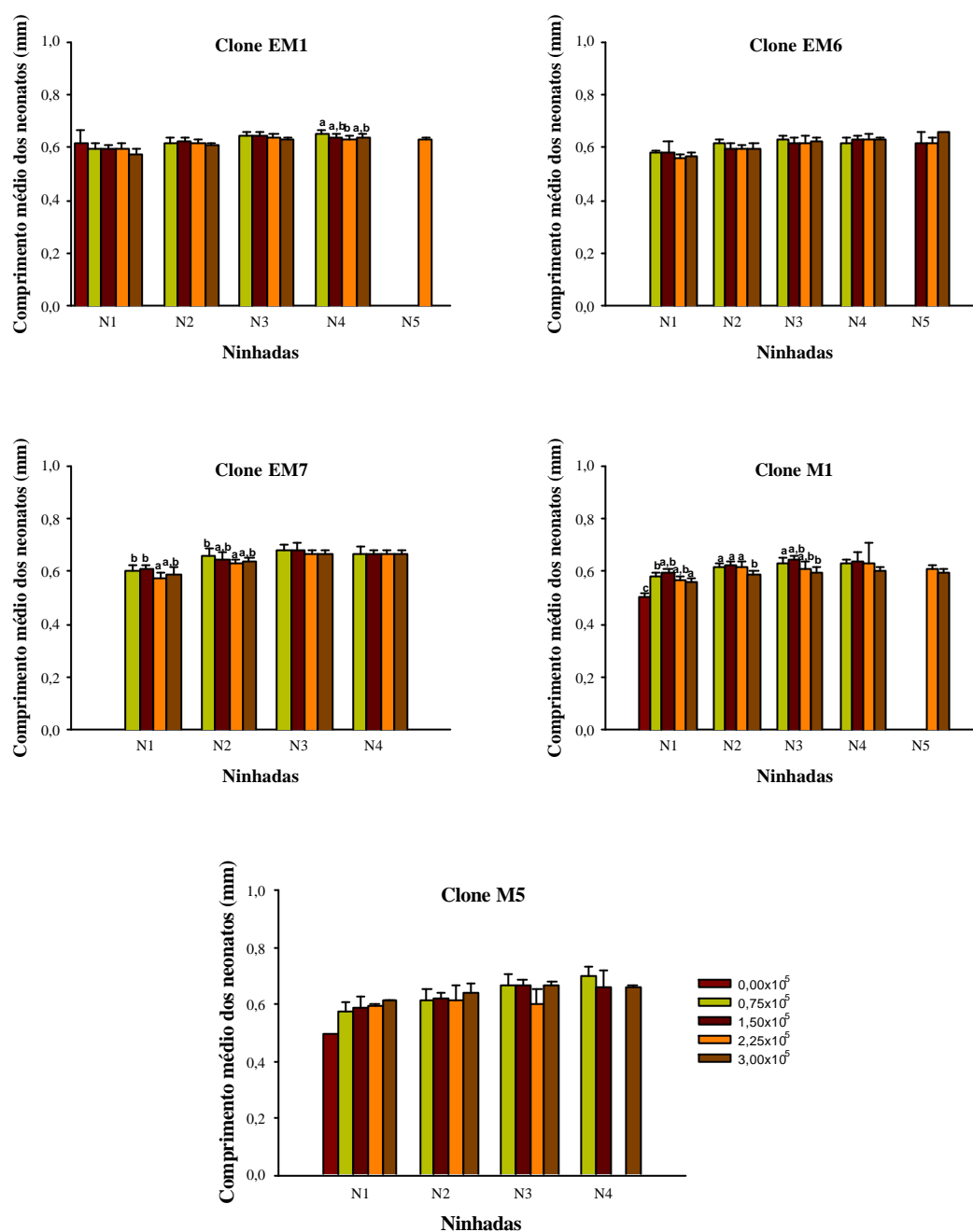


Figura III.2.3.2 – Comprimento médio dos neonatos (mm) produzidos em cada ninhada para os clones EM1, EM6, EM7, M1 e M5. As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ). As diferentes concentrações são expressas em céls/ml/dia.

### **III.3 – REPRODUÇÃO, CRESCIMENTO E PARÂMETROS POPULACIONAIS**

Após a análise dos parâmetros parciais acima discriminados, revelou-se de interesse aprofundar a análise para alguns resultados globais (idade à primeira reprodução, número total de neonatos produzidos por organismo, biomassa total das ninhadas, número de ninhadas, taxa de crescimento diário e taxa de incremento populacional). Ao passo que os parâmetros até aqui analisados (com excepção da mortalidade) diziam respeito à análise das ninhadas individualmente, daqui em diante serão analisados os parâmetros globais (reprodução, crescimento, crescimento populacional) acima discriminados. Para tal, foi realizada uma ANOVA bifactorial em que os resultados estão sumariados na Tabela III.3.1. Como a tabela III.3.1 demonstra, é nítida a existência de diferenças significativas entre os clones e entre os diferentes níveis alimentares para os vários parâmetros. Verificou-se também a ocorrência de uma interacção significativa entre os clones e os níveis alimentares para todos os parâmetros medidos, o que significa que existe dependência entre os clones e os níveis alimentares. Isto é, os diferentes clones respondem (em termos reprodutivos, de crescimento e demográficos) de forma diferente aos diferentes níveis alimentares. Por este motivo, procedeu-se à análise individual das respostas de cada clone (Tabelas III.3.2 e III.3.3), com vista a melhor compreender o padrão de resposta de cada clone aos níveis alimentares (ver secções seguintes).

Tabela III.3.1 – Tabela sumário da ANOVA bifactorial para os parâmetros obtidos no ensaio de *Daphnia longispina* com diferentes concentrações de alimento. A idade à primeira reprodução (dias), o número total de neonatos, a biomassa total das ninhadas (mg), o número de ninhadas, a taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) e a taxa de incremento populacional ( $\text{dia}^{-1}$ ) foram analisados, visando detectar os efeitos dos clones, do nível alimentar e a sua interacção, (g.l – graus de liberdade).

PARÂMETROS	FONTE DE VARIAÇÃO	F	g.l	P
<b>Idade à Primeira Reprodução (dias)</b>	Clone	6,2	9, 311	$4,88 \times 10^{-08}$
	Nível alimentar	14,6	3, 311	$6,5 \times 10^{-09}$
	Interacção	3,1	27, 311	$9,98 \times 10^{-07}$
<b>Número Total de Neonatos</b>	Clone	22,4	8, 288	$1,65 \times 10^{-26}$
	Nível alimentar	138,6	4, 288	$7,40 \times 10^{-66}$
	Interacção	4,5	32, 888	$1,79 \times 10^{-12}$
<b>Biomassa Total das Ninhadas (mg)</b>	Clone	6,7	8, 288	$4,15 \times 10^{-08}$
	Nível alimentar	106,5	4, 288	$1,42 \times 10^{-55}$
	Interacção	3,3	32, 288	$6,26 \times 10^{-08}$
<b>Número de Ninhadas</b>	Clone	11,1	8, 288	$1,27 \times 10^{-13}$
	Nível alimentar	271,0	4, 288	$2,71 \times 10^{-96}$
	Interacção	2,7	32, 888	$5,59 \times 10^{-06}$
<b>Taxa de Crescimento Diário (<math>\text{dia}^{-1}</math>)</b>	Clone	11,8	8, 286	$1,42 \times 10^{-14}$
	Nível alimentar	115,7	4, 286	$1,49 \times 10^{-58}$
	Interacção	2,2	32, 286	$4,35 \times 10^{-04}$
<b>Taxa de Incremento Populacional (<math>\text{dia}^{-1}</math>)</b>	Clone	12,2	9, 335	$1,15 \times 10^{-16}$
	Nível alimentar	5,2	3, 335	$1,06 \times 10^{-03}$
	Interacção	2,5	27, 335	$6,20 \times 10^{-05}$

Tabela III.3.2 – Tabela sumário da ANOVA unifactorial para os parâmetros obtidos no ensaio de *Daphnia longispina* (clones provenientes da lagoa da Vela) com diferentes concentrações de alimento. A idade à primeira reprodução (dias), o número total de neonatos, a biomassa total das ninhadas (mg), o número de ninhadas, a taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) e a taxa de incremento populacional ( $\text{dia}^{-1}$ ) foram analisados, visando detectar os efeitos do nível alimentar para cada clone. A negrito são evidenciados os valores para os quais não se registaram diferenças significativas, (g.l – graus de liberdade).

CLONE	PARÂMETROS	F	g.l.	P
<b>EV6</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	2,1	3, 23	<b>0,129</b>
	Número Total de Neonatos	13,9	4, 31	$1,33 \times 10^{-06}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	11,0	4, 31	$1,18 \times 10^{-05}$
	Número de Ninhadas	17,2	4, 31	$1,61 \times 10^{-07}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	14,7	4, 31	$7,93 \times 10^{-07}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	0,5	3, 28	<b>0,705</b>
<b>EV20</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	3,0	3, 33	0,045
	Número Total de Neonatos	15,9	4, 34	$1,95 \times 10^{-07}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	9,7	4, 34	$2,45 \times 10^{-05}$
	Número de Ninhadas	25,8	4, 34	$6,91 \times 10^{-10}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	18,9	4, 33	$3,66 \times 10^{-08}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	4,9	3, 35	$6,0 \times 10^{-03}$
<b>V3</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	6,9	3, 35	0,001
	Número Total de Neonatos	82,3	4, 38	$3,47 \times 10^{-18}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	21,5	4, 38	$2,51 \times 10^{-09}$
	Número de Ninhadas	86,8	4, 38	$1,41 \times 10^{-18}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	235,4	4, 38	$2,97 \times 10^{-26}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	1,7	3, 36	<b>0,194</b>
<b>V5</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	3,12	3, 20	0,049
	Número Total de Neonatos	24,5	4, 17	$7,14 \times 10^{-07}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	20,8	4, 17	$2,32 \times 10^{-06}$
	Número de Ninhadas	16,9	4, 17	$9,18 \times 10^{-06}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	26,1	4, 16	$7,72 \times 10^{-07}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	4,26	3, 23	0,016
<b>V8</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	12,7	3, 34	$9,7 \times 10^{-06}$
	Número Total de Neonatos	87,6	3, 26	$1,02 \times 10^{-13}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	56,6	3, 26	$1,58 \times 10^{-11}$
	Número de Ninhadas	57,1	3, 26	$1,41 \times 10^{-11}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	46,2	3, 26	$1,48 \times 10^{-10}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	4,7	3, 36	$7,0 \times 10^{-03}$

Tabela III.3.3 – Tabela sumário da ANOVA unifactorial para os parâmetros obtidos no ensaio de *Daphnia longispina* (clones provenientes da lagoa de Mira) com diferentes concentrações de alimento. A idade à primeira reprodução (dias), o número total de neonatos, a biomassa total das ninhadas (mg), o número de ninhadas, a taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) e a taxa de incremento populacional ( $\text{dia}^{-1}$ ) foram analisados, visando detectar os efeitos do nível alimentar para cada clone. A negrito são evidenciados os valores para os quais não se registaram diferenças significativas, (g.l – graus de liberdade).

CLONES	PARÂMETROS	F	g.l	P
<b>EM1</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	7,4	3, 34	0,001
	Número Total de Neonatos	109,3	4, 36	$1,29 \times 10^{-19}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	80,5	4, 36	$1,9 \times 10^{-17}$
	Número de Ninhadas	169,9	4, 36	$7,75 \times 10^{-23}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	13,5	4, 36	$8,05 \times 10^{-07}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	4,0	3, 35	0,015
<b>EM6</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	2,3	3, 36	<b>0,089</b>
	Número Total de Neonatos	23,5	4, 36	$1,29 \times 10^{-09}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	12,6	4, 36	$1,66 \times 10^{-06}$
	Número de Ninhadas	45,9	4, 36	$1,16 \times 10^{-13}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	21,3	4, 35	$5,66 \times 10^{-09}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	7,9	3, 36	$3,43 \times 10^{-04}$
<b>EM7</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	0,7	3, 36	<b>0,578</b>
	Número Total de Neonatos	209,7	4, 40	$2,94 \times 10^{-26}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	47,1	4, 40	$1,30 \times 10^{-14}$
	Número de Ninhadas	435,3	4, 40	$2,19 \times 10^{-32}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	27,0	4, 40	$6,64 \times 10^{-11}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	17,8	3, 36	$3,03 \times 10^{-07}$
<b>M1</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	3,5	3, 35	0,025
	Número Total de Neonatos	16,0	4, 39	$8,00 \times 10^{-08}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	19,9	4, 39	$5,51 \times 10^{-09}$
	Número de Ninhadas	90,4	4, 39	$3,48 \times 10^{-19}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	25,2	4, 39	$2,32 \times 10^{-10}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	6,4	3, 36	$1,0 \times 10^{-03}$
<b>M5</b>	Idade à Primeira Reprodução (dias)	3,2	3,25	0,039
	Número Total de Neonatos	7,2	4, 17	$1,42 \times 10^{-03}$
	Biomassa Total das Ninhadas (mg)	4,6	4, 17	$1,08 \times 10^{-02}$
	Número de Ninhadas	3,9	4, 17	$8,41 \times 10^{-03}$
	Taxa de Crescimento Diário ( $\text{dia}^{-1}$ )	7,4	4, 17	$1,18 \times 10^{-03}$
	Taxa de Incremento Populacional ( $\text{dia}^{-1}$ )	1,1	3, 34	<b>0,364</b>



### III.3.1 – Parâmetros reprodutivos

#### III.3.1.1 - Idade à primeira reprodução

Os dados relativos à idade à primeira reprodução revelaram que a menor concentração de alimento retardou claramente a reprodução dos organismos. Inclusivamente, foram poucos os organismos expostos a este jejum que efectivamente produziram descendência. Dado que não foi possível calcular o tempo à primeira reprodução para todos os organismos expostos à concentração de 0,00 céls/ml/dia, a análise dos dados foi levada a cabo apenas para as restantes concentrações. Todavia, optou-se por apresentar a informação relativa ao tratamento sem alimento nos gráficos (Figura III.3.1.1.1), para efeitos meramente comparativos (o tempo à primeira reprodução foi calculado com os elementos disponíveis). Nos clones provenientes da lagoa da Vela foram registadas diferenças significativas nos clones V3 ( $F=6,9$ ;  $g.l=3, 35$ ;  $P=0,001$ ), V5 ( $F=3,1$ ;  $g.l=3, 20$ ;  $P=0,049$ ), V8 ( $F=12,7$ ;  $g.l=3, 34$ ;  $P=9,71 \times 10^{-06}$ ) e no clone ehippial EV20 ( $F=43,0$ ;  $g.l=3, 33$ ;  $P=0,045$ ), porém, o teste de Tukey não conseguiu detectar diferenças para este último clone. Nos clones vindos da lagoa de Mira foram registadas diferenças significativas na idade à primeira reprodução entre os vários níveis alimentares nos clones EM1 ( $F=7,4$ ;  $g.l=3, 34$ ;  $P=0,001$ ), M1 ( $F=3,5$ ;  $g.l=3, 35$ ;  $P=0,025$ ). O clone M5 revelou diferenças significativas ( $F=3,2$ ;  $g.l=3, 25$ ;  $P=0,039$ ) mas o teste de Tukey não detectou diferenças entre os tratamentos. De uma forma geral, não foi possível destacar claramente nenhuma concentração alimentar que se tenha revelado responsável por provocar um adiantamento ou atraso na idade de produção da primeira ninhada dos organismos de teste.

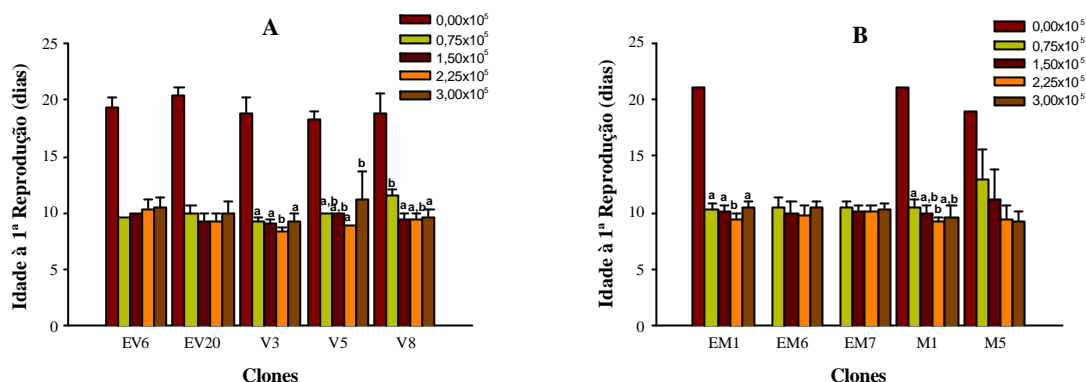


Figura III.3.1.1.1- Idade à primeira reprodução nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

### III.3.1.2 – Número total de neonatos

Os dados relativos ao número total de neonatos produzidos por fêmea nas diferentes concentrações alimentares, estão ilustrados na Figura III.3.1.2.1, ao passo que a significância das ANOVAs relativas a cada parâmetro está exposta nas Tabelas III.3.2 (lagoa da Vela) e III.3.3 (lagoa de Mira). O número de neonatos produzidos pelos clones EV20 e V8 nas concentrações de  $1,50 \times 10^5$  e  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia revelou ser significativamente superior às outras concentrações. No entanto, a concentração de  $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia pareceu a mais favorável para o clone EV6 para uma maior produção de neonatos, apesar de não se terem observado diferenças significativas. Para o clone V3, a concentração de  $1,50 \times 10^5$  céls/ml/dia demonstrou ser a mais favorável para uma maior produção de neonatos, ao passo que para o clone V5 foi a concentração de  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia. Relativamente aos clones de Mira, o clone EM1 produziu um maior número de neonatos entre as concentrações de  $1,50 \times 10^5$  e  $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia. Por sua vez, os clones EM6 e EM7 tiveram a sua maior produção de neonatos nas duas concentrações alimentares mais elevadas ( $2,25 \times 10^5$  e  $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia). Para o clone M1, o valor de  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia de concentração demonstrou ser o mais adequado para a produção de neonatos. A reprodução foi significativamente incrementada na concentração de  $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia para o clone M5.

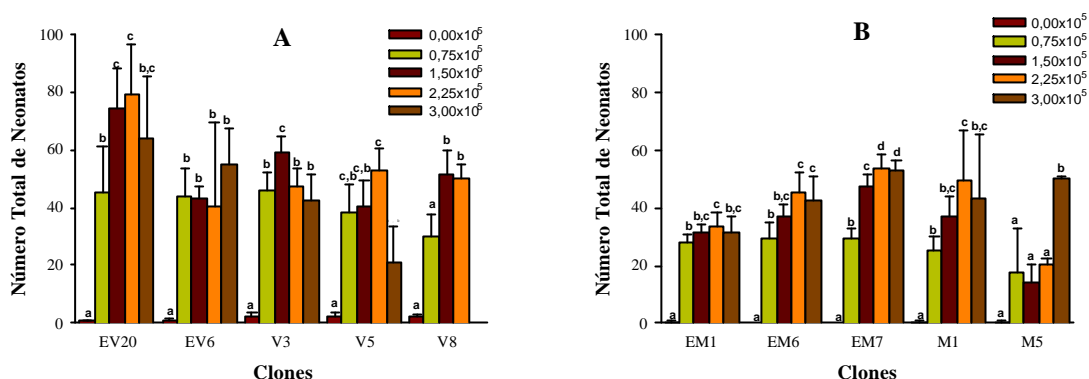


Figura III.3.1.2.1- Número total de neonatos por fêmea nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c,d) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

### III.3.1.3 – Número e biomassa total das ninhadas

Os resultados do número de ninhadas que ocorreram ao longo do teste nas diferentes concentrações alimentares, estão ilustrados na Figura III.3.1.3.1 e a sua significância nas Tabela III.3.2 (lagoa da Vela) e III.3.3 (lagoa de Mira). O número de ninhadas produzidas nas diferentes concentrações alimentares pelos clones provenientes da lagoa da Vela responderam de forma similar aos parâmetros mencionados anteriormente, à excepção do clone V3, onde não foram registadas diferenças significativas entre os cinco níveis alimentares. Relativamente aos clones recolhidos na lagoa de Mira, na generalidade, estes revelaram que as diferentes concentrações alimentares não afectaram o número de ninhadas (excluindo a ausência de alimento).

Os resultados das biomassas totais das ninhadas nas diferentes concentrações alimentares estão ilustrados nas Tabela III.3.2 (lagoa da Vela) e Tabela III.3.3 (lagoa de Mira) e na Figura III.3.1.3.2. As respostas da biomassa total das ninhadas revelaram um padrão muito semelhante ao número total de neonatos por fêmea. Os clones EV20, V8 e EV6 revelam as mesmas preferências de concentrações ( $1,50 \times 10^5$  e  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia) que já tinham demonstrado para o número total de neonatos. Verificou-se uma vez mais que a concentração de  $1,50 \times 10^5$  céls/ml/dia foi a mais favorável para o clone V3 e a de  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia para o clone V5. No respeitante aos clones de campo, mais uma vez se destaca a

concentração mais elevada ( $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia) como a que mais favorece a resposta reprodutiva do clone M5.

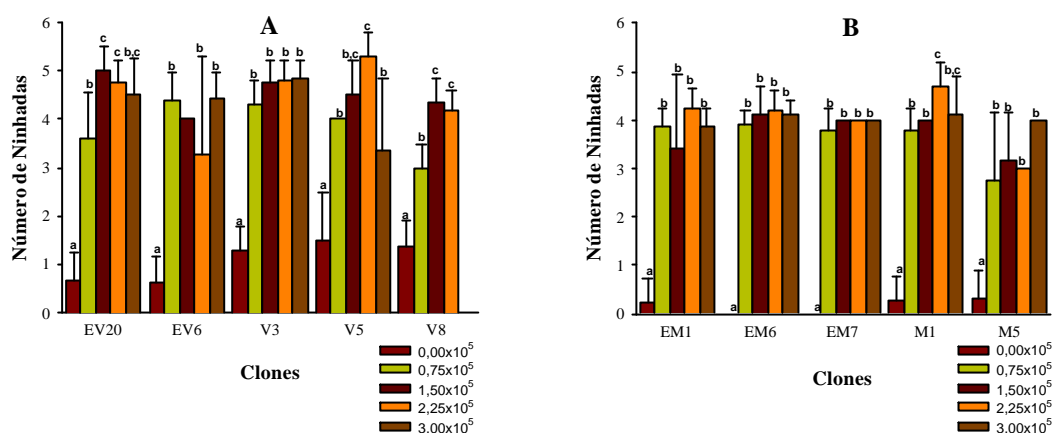


Figura III.3.1.3.1- Número de ninhadas nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

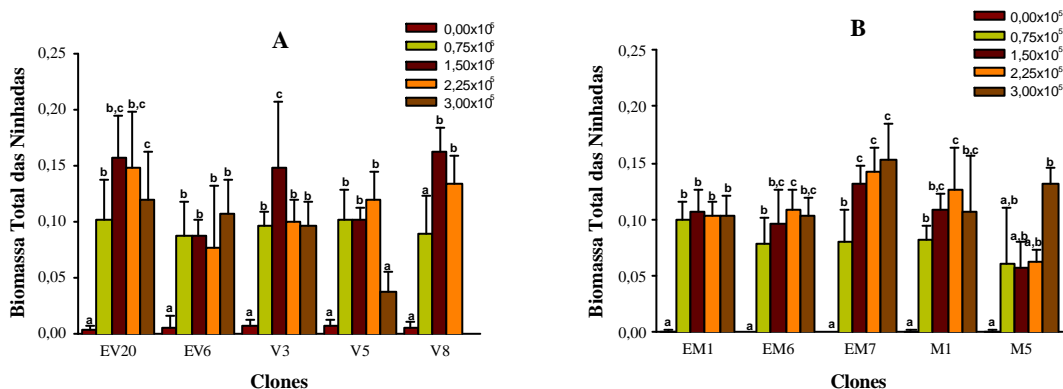


Figura III.3.1.3.2- Biomassa total das ninhadas (mg) nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

### III.3.2.1 – Taxa de crescimento diário

Os dados relativos ao crescimento dos organismos de teste nas diferentes concentrações alimentares estão ilustrados na Figura III.3.2.1.1, ao passo que a significância das ANOVAs relativas a cada parâmetro está exposta nas Tabelas III.3.2 (lagoa da Vela) e III.3.3 (lagoa de Mira). A taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) não foi significativamente afectada para qualquer dos clones ehippiaes (EV6, EV20, EM1, EM6 e EM7) tal como para o clone de campo V5. No entanto, o crescimento do clone V3 foi significativamente estimulado pela concentração alimentar de  $1,50 \times 10^5$  céls/ml/dia. Consistentemente com os outros parâmetros já apresentados, os clones M1 e M5 registaram diferenças significativas nas taxas de crescimento nas concentrações de  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia e  $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia, respectivamente.

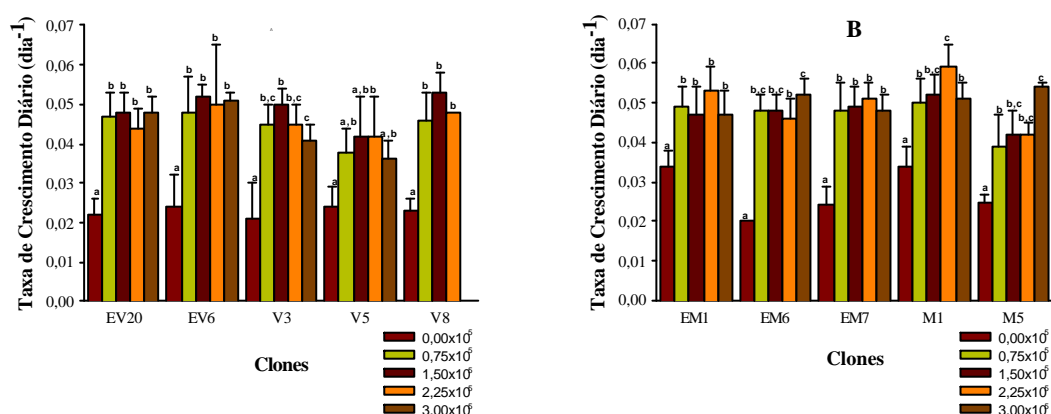


Figura III.3.2.1.1- Taxa de crescimento diário ( $\text{dia}^{-1}$ ) nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

### III.3.3.1 – Taxa de incremento populacional

A Figura III.3.3.1.1 ilustra as taxas de incremento populacional obtidas para os diferentes clones expostos aos vários níveis alimentares. Os níveis de significância associados a esta variável encontram-se discriminados nas Tabelas III.3.2 (lagoa da Vela) e III.3.3 (lagoa de Mira). O padrão de resposta registado na taxa de incremento populacional foi semelhante ao observado noutros parâmetros. De facto, com a excepção dos clones V3 e M5 (não revelaram diferenças significativas entre o  $r$ ), o padrão de resposta foi bastante similar ao observado para o número total e para a biomassa total de neonatos.

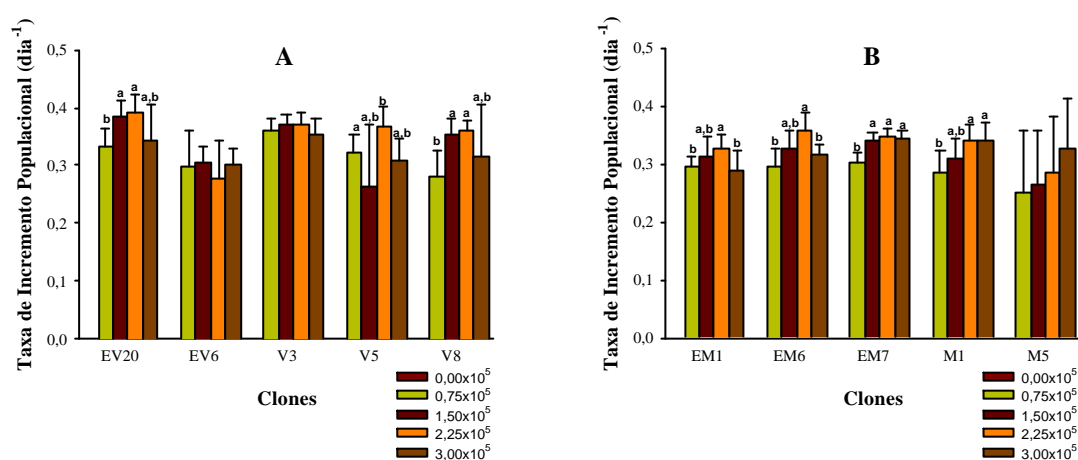


Figura III.3.3.1.1- Taxa de incremento populacional nas diferentes concentrações de alimento (expressas em céls/ml/dia) para os clones provenientes da lagoa da Vela (A) e da lagoa de Mira (B). As barras de erro indicam o desvio padrão, e as diferentes letras (a,b,c) representam diferenças significativas entre os diferentes níveis alimentares (Teste exacto de Fisher  $P \leq 0,05$ ).

### III.4 – ANÁLISE MULTIVARIÁVEL

A integração dos dados relativos ao número total de neonatos, à biomassa total das ninhadas, ao número de ninhadas e à taxa de crescimento diário aos diferentes níveis alimentares resultou no dendrograma representado na Figura III.4.1. O clone V8 foi excluído desta análise, uma vez que não se obteve respostas para a concentração de  $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia já que todos os organismos morreram. Os clones apresentaram uma elevada similaridade (>95%). Foi possível registar a ocorrência de um grupo (mais ou menos) definido pelos clones EV6, EV20, V3, EM1, EM6, EM7 e M1. Um clone que se revelou completamente diferente dos outros foi M5, o que já tinha sido observado anteriormente.

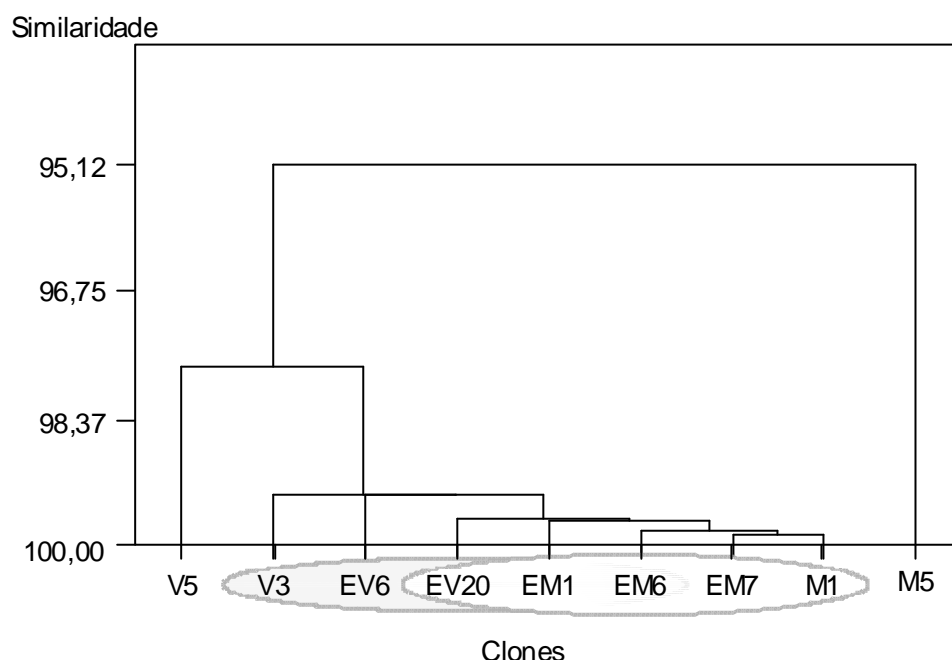


Figura III.4.1- Dendrograma obtido por uma análise de classificação (UPGMA, correlação de Pearson) através das respostas médias de cada clone aos diferentes níveis alimentares.

## **IV - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**





## IV – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Mortalidades altas e consistentes foram observadas em alguns clones (V5, V8 e M5), em todas as concentrações alimentares testadas, sugerindo que estes clones poderiam não estar completamente adaptados às condições laboratoriais. O meio de cultura usado e o alimento fornecido (*S. capricornutum*) poderão não ser as condições mais apropriadas para a correcta manutenção destes clones. Quando os dafnídeos são mantidos em laboratório, com todas as condições controladas, os factores de stress normalmente existentes no campo estão ausentes, assim reduzindo as taxas de mortalidade intrínseca. Adicionalmente, sabendo que a concentração de *S. capricornutum* usada nas culturas de manutenção foi de  $1,50 \times 10^5$  céls/ml/dia, seria de esperar baixas mortalidades perto desta concentração. Esta situação verificou-se na maioria dos clones, registando-se altas mortalidades essencialmente nos extremos das concentrações testadas (ausência de alimento e  $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia). Os clones EM6, EM7 e M1 revelaram mortalidades baixas ou mesmo nulas em todas as concentrações alimentares testadas (à excepção da concentração de ausência de alimento  $0,00 \times 10^5$  céls/ml/dia).

A análise estatística revelou uma interacção significativa entre os clones e os diferentes níveis alimentares, sendo extremamente significativa para os parâmetros reprodutivos (número de neonatos, biomassa total das ninhadas, número de ninhadas, idade à primeira reprodução), de crescimento (taxa de crescimento diário) e demográficos ( $r$ ). Tal situação indica que as respostas clonais aos diferentes níveis alimentares não são idênticas para todos os clones, ou seja, as respostas dos vários clones de *D. longispina* diferem quando sujeitos às concentrações testadas. De facto, a variação clonal em cladóceros é um tema bastante estudado, tendo sido encontradas diferenças entre clones ao nível de sobrevivência, fecundidade e taxa de incremento populacional quando expostos a diferentes condições alimentares (e.g., Epp, 1996; Repka, 1997, 1998) ou a contaminantes (Barata *et al.*, 2000).

Registou-se uma redução da reprodução e do crescimento em todos os clones, para a concentração mais baixa ( $0,00$  céls/ml/dia). Contudo, enquanto alguns clones (e.g. EV6, EM7 e M5) apresentaram um aumento reprodutivo com o incremento da concentração

alimentar, outros (e.g. V3, V5 e EV20) apresentaram uma redução na produção de neonatos nos níveis mais altos de alimento. Gliwicz e Guisande (1992) demonstraram que a quantidade de energia que os organismos investem na reprodução depende directamente do alimento disponível. Regra geral, baixas concentrações alimentares resultam num decréscimo do número de neonatos em cada ninhada (Gliwicz e Guisande, 1992; Guisande e Gliwicz, 1992; Gliwicz e Boavida, 1996) o que se vai alterando com o aumento progressivo da concentração algal, até um limite pré-definido geneticamente (Lampert, 1978). Esta situação foi verificada na maioria dos clones testados. Contudo, em alguns casos, as altas concentrações alimentares levaram à diminuição do rendimento reprodutivo. O tipo de resposta observado nesses clones pode dever-se aos efeitos inibitórios resultantes da exposição a altas concentrações alimentares (Ryther, 1954) ou à baixa qualidade alimentar. Assim, poderá levantar-se a hipótese de que *S. capricornutum* não será a fonte alimentar apropriada para alguns clones. Na verdade, vários autores apontam que a qualidade alimentar (qualidade e diversidade algal) é o factor primordial em experiências de fecundidade (Gulati e Demott, 1997; Kilham *et al.*, 1997; Repka, 1997, 1998; Hülsmann, 2001). De modo a aprofundar esta ideia, seria relevante elaborar estudos mais detalhados sobre as dietas alimentares destes organismos. Para além da mistura de *taxa* algais existentes em lagos, é frequentemente registada a ocorrência de uma diversificada comunidade bacterioplactónica. Estas duas componentes constituem a dieta dos cladóceros nos sistemas lênticos (Wylie e Currie, 1991; Ojala *et al.*, 1995). O ambiente laboratorial é, nesse aspecto, reducionista, já que a alimentação é constituída normalmente por uma única espécie. Assim, seria interessante pôr em prática experiências laboratoriais simulando diversos cenários alimentares, ou recorrer à experimentação *in situ*, com vista a obter informações mais realistas de um ponto de vista ecológico.

O padrão de variação da taxa de incremento populacional confirmou o que foi observado para os parâmetros reprodutivos. A taxa de incremento populacional é um melhor indicador do ciclo de vida dos dafnídeos do que a fecundidade, na medida em que integra simultaneamente a fecundidade e a mortalidade específicas de cada idade. O  $r$  médio mostrou estar de acordo com os valores de taxas de incremento populacional calculados por outros autores para *D. pulex* (Lüring e Van Donk, 1997) e *D. galeata* (Repka, 1997), mas mais altos do que os observados para *D. cucullata* (Repka, 1998). No entanto, e ao

contrário do que se verificou para a taxa de incremento populacional, foram observadas diferenças significativas no número de ninhadas produzidas pelo clone V3 e M5, o que pode estar relacionado com as altas mortalidades observadas, especialmente no clone M5. Para os clones V5, EM1 e EM6, a concentração de  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia foi onde se registaram valores mais elevados de  $r$ . Os clones EM7 e M1 apresentaram respostas mais ou menos similares aos restantes clones, excepção feita ao valor de  $r$  que não decresceu na concentração alimentar mais elevada ( $3,00 \times 10^5$  céls/ml/dia). M5, EV6 e V3 não revelaram diferenças significativas entre os vários níveis alimentares.

Relativamente à idade à primeira reprodução apresentada pelos vários clones nas diferentes concentrações alimentares não houve nenhuma concentração que se destacasse, com excepção da concentração de ausência de alimento que retardou a primeira reprodução. Para o clone V8, também a concentração  $0,75 \times 10^5$  céls/ml/dia revelou ser responsável pelo atraso da primeira reprodução. A concentração de  $2,25 \times 10^5$  céls/ml/dia revelou ser a que originou neonatos mais cedo, para os clones V3, V5, EM1 e M1. Kilham *et al.* (1997) descreveram também que a qualidade do alimento pode retardar o tempo à primeira reprodução. Assim, parece que a quantidade de alimento não é factor único e suficiente para a dieta alimentar de modo que ocorra um bom desenvolvimento/crescimento de cladóceros. A qualidade do alimento é um factor de igual importância para que a reprodução, fecundidade e crescimento dos organismos seja mais favorável.

Na generalidade, a análise multivariável, revelou ser coerente com o padrão de respostas obtido para a taxa de incremento populacional. Os clones EV20, EM1, EM6, EM7 e M1 (altos valores de  $r$  para as concentrações alimentares intermédias) revelaram ser mais próximos dos clones EV6 e V3 (sem diferenças significativas entre os tratamentos para os valores de  $r$ ). Nos clones V5 e M5 foi observada uma produção mais elevada de neonatos nas mesmas concentrações alimentares onde foram observadas altas mortalidades, o que se reflectiu na análise multivariável como os clones mais afastados dos restantes. A explicação para tal associação não é evidente, uma vez que a mortalidade pode estar relacionada com a falta de adaptação às condições laboratoriais (meio de cultura, fonte de alimento) ou com a quantidade de alimento disponível. Tal situação não ocorre no campo, onde a dieta alimentar é mais diversa (algas, bactérias, rotíferos) (Wyllie e Currie, 1991; Montel e Lair, 1997) e o meio aquoso é constituído por inúmeros nutrientes. Numa análise mais profunda

do dendrograma obtido, não foi possível observar uma distinção clara entre os clones de campo e *ephippia*s. Deste modo, dentro da gama das concentrações alimentares testadas, todos os clones tiveram respostas muito idênticas quanto ao crescimento, reprodução e taxa de incremento populacional. Porém, os clones V5 e M5 aparentaram ter padrões de resposta mais distantes aos dos outros clones. Cada clone comportou-se de um modo, apresentando uma resposta distinta ao factor de stress a que foi sujeito. A existência de diferentes respostas em cada clone revela a importância que cada organismo representa num ecossistema.

A variação clonal é uma importante característica em ecossistemas lênticos dulçaquícolas, e a nova reserva genética fornecida pelas populações provenientes da eclosão de *ephippia* desempenha um papel evolutivo crucial (Hairston, 1996). O estado de um lago eutrófico pode ser alterado pelas novas populações *ephippia*s, dependendo de estas serem mais ou menos susceptíveis do que a população original a elevados níveis de fitoplâncton. Arbačiauskas e Gasiūnaitė (1996) demonstraram a importância das populações provenientes de ovos de resistência no restabelecimento das novas populações do ecossistema.

Os resultados aqui relatados demonstraram que alguns clones (indiferentemente de serem provenientes do campo ou de *ephippia*) aumentam o rendimento reprodutivo quando sujeitos a altos níveis alimentares. Tais populações podem ser introduzidas como herbívoros activos em lagos eutróficos pouco profundos. De facto, gerações de clones laboratoriais seleccionados poderão ser um bom instrumento de biomanipulação em ecossistemas eutróficos, combinado com a manipulação de peixes e macrófitas (McDougal e Goldsborough, 1996; Jeppesen *et al.*, 1997; Talberg *et al.*, 1999; Søndergaard *et al.*, 2000). Tal situação é particularmente relevante tendo em conta o papel fundamental do controlo do zooplâncton sobre o fitoplâncton, principalmente em lagos eutróficos pouco profundos (Jeppesen *et al.*, 1997,1999).

Em suma, os resultados obtidos pelo presente trabalho satisfazem completamente os objectivos enunciados. A variabilidade de respostas verificadas para os diferentes clones testados foi notavelmente observada, porém este padrão não foi visível na diferenciação entre clones de campo e clones provenientes de *ephippia*. Contudo, esta situação não foi verificada quando se tentaram comparar as populações das diferentes lagoas ou da proveniência dos clones (campo/*ephippia*). Com as respostas obtidas é possível afirmar que,

provavelmente, são os factores ambientais (e.g. poluição, temperatura, quantidade de nutrientes) os principais responsáveis pelo comportamento no ciclo de vida dos clones. Porém, Barata *et al.*, (2000) demonstraram que a origem espacial (local de proveniência) dos clones seria a principal razão para o variado leque de respostas. No entanto, o presente trabalho revelou que para organismos sujeitos a uma mesma gama climática as respostas clonais diferem, logo só os factores ambientais e/ou de stress podem ser os responsáveis por tal situação.

## CONCLUSÕES

A disponibilidade de recursos alimentares é um dos factores essenciais que controla a estrutura das comunidades zooplancónicas em sistemas dulçaquícolas lênticos. A variabilidade clonal das respostas dos zooplancóntes em diferentes níveis alimentares poderá justificar o seu uso na manipulação de lagos eutrofizados. Os resultados obtidos ao longo do presente trabalho revelaram a existência de diferenças (e.g., sobrevivência, fecundidade e taxa de incremento populacional) entre os vários clones nas suas respostas ao longo do ciclo de vida, quando sujeitos a variados níveis alimentares. Contudo, a falta de diferenças visíveis entre as populações (*ephippia* e campo) recolhidas nas lagoas da Vela e de Mira poderá ser explicada pelo facto de estas populações serem provenientes de sistemas eutróficos, sob o mesmo stress alimentar. Assim, parecem ser os factores ambientais e/ou de stress e não a proveniência espacial dos clones, os factores determinantes nas respostas do ciclo de vida de *D. longispina*. Os clones que alcançaram altas taxas de incremento populacional nas concentrações alimentares mais elevadas poderão ser usados na biomanipulação de lagos eutróficos. A variação clonal associada às respostas crónicas de *Daphnia* face à quantidade e qualidade alimentar deverão ser adicionalmente exploradas, dada a importância da herbivoria no controlo do fitoplâncton, com especial ênfase em lagos pouco profundos.

## **V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Arbaèiauskas K e Gasiūnaitė ZR (1996). Growth and fecundity of *Daphnia* after diapause and their impact on the development of a population. *Hydrobiologia* **320**:209-222.
- Arbaèiauskas K (1998). Life-history traits of exephippial and parthenogenetically derived daphnids: indicators of different life-history strategies. *Arch. Hydrobiol.* **52**:339-358.
- Arbaèiauskas K (2001). Life-history variation related to the first adult instar in daphnids derived from diapausing and subitaneous eggs. *Hydrobiologia* **442**:157-164.
- ASTM (1980). Standard Practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Reports E. 729-80. American Standards for Testing and Materials, Philadelphia.
- Baird DJ, Soares AMVM, Girling A, Barber I, Bradley MC e Callow P (1988). The long-term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use ecotoxicity tests: Problems and prospects. In H. Lokke, H. Tyle and F. Bron-Rasmussen, eds., Proceedings First European Conference on Ecotoxicology, October 17-19, 1988, Lyngby, Denmark, pp. 144-148.
- Barata C, Baird DJ, Amat F, e Soares AMVM (2000). Comparing population response to contaminants between laboratory and field: an approach using *Daphnia magna* ephippial egg banks. *Functional Ecology* **14**:513-523.
- Barros P (1994). Implicações ecotoxicológicas de cianobactérias em cladóceros. Dissertação de Mestrado em Ecologia Animal, Universidade de Coimbra, Coimbra, pp. 84
- Berner DB, Nguyen L, Nguy S e Burton S (1991). Photoperiod and temperature as inducers of gamogenesis in a dicyclic population of *Scapholeberis armata* Herrick (Crustacea: Cladocera: Daphniidae). *Hydrobiologia* **225**:269-280.



- Boersma M, De Meester L, e Spaak P (1999). Environmental stress and local adaptation in *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography* **44**:393-402.
- Boersma M, Boriss H e Mitchell SE (2000). Maternal effects after sexual reproduction in *Daphnia magna*. *Journal of Plankton Research* **22**(2):279-285.
- Bunner HC e Halcrow K (1977). Experimental induction of the production of ephippia by *Daphnia magna* Straus (Cladocera). *Crustaceana* 32(1):77-86.
- Burns CW (2000). Crowding-induced changes in growth, reproduction and morphology of *Daphnia*. *Freshwater Biology* **43**:19-29.
- Carvalho GR e Crisp DJ (1987). The clonal ecology of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) I. Temporal changes in the clonal structure of a natural population. *Journal of Animal Ecology* **56**:453-468.
- Carvalho GR e Hughes RN (1983). The effect of food availability, female culture-density and photoperiod on ephippia production in *Daphnia magna* Staus (Crustacea: Cladocera). *Freshwater Biology* **13**: 37-46.
- Carvalho GR e Wolf HG (1989). Resting eggs of lake-*Daphnia* I. Distribution, abundance and hatching of eggs collected from various depths in lake sediments. *Freshwater Biology* **22**:459-470.
- Dahms HU (1995). Dormancy in the Copepoda – an overview. *Hydrobiologia* **306**:199-211.
- Davison J (1969). Activation of the ephippial - Egg of *Daphnia pulex*. *The Journal of General Physiology* **53**:562-575.
- De Meester L e De Jager H (1993 a). Hatching of *Daphnia* sexual eggs. I. Intraspecific differences in the hatching responses of *D. magna* eggs. *Freshwater Biology* **30**:219-226.

- De Meester L e De Jager H (1993 b). Hatching of *Daphnia* sexual eggs. II. The effect of age and a second stimulus. *Freshwater Biology* **30**:227-233.
- Deng HW (1996). Environmental and genetic control of sexual reproduction in *Daphnia*. *Heredity* **76**:449-458.
- DeSanto RS (1978). Concepts of applied ecology. Springer-Verlag, New York. pp. 310.
- De Stasio BT Jr, Rudstam LG, Haning A, Soranno P e Allen YC (1995). An in situ test of the effects of food quality on *Daphnia* population growth. *Hydrobiologia* **307**:221-230.
- Dohet A e Hoffmann L (1995). Seasonal succession and spatial distribution of the zooplankton community in the reservoir of Esch-sur-Sûre (Luxembourg). *Belg J Zool* **125**(1):109-123.
- Doma S (1979). Ehippia of *Daphnia magna* Straus - a technique for their mass production and quick revival. *Hydrobiologia* **67**(2):183-188.
- EPA - Environmental Protection Agency. (1989). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. EPA/600/4-89/001, U.S. Environmental Protection Agency, Weber C.I., Peltier W.H., Norbergking T.J., Horning W.B., Kessler F.A., Menkedick J.R., Neiheisell T.W., Lewis P.A., Klemm D.J., Pickring Q.H., Robinson E.L., Lazorchak J.M., Wymer L.J. and Freyberg R.W. Eds., Cincinnati, Ohio.
- Ferrão-Filho AS, Azevedo SMFO e DeMOTT WR (2000). Effects of toxic and non-toxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans. *Freshwater Biology* **45**:1-19.
- Glazier DS (1998). Does body storage act as a food-availability cue for adaptive adjustment of egg size and number in *Daphnia magna*? *Freshwater Biology* **40**:87-92.

- Gliwicz ZM e Boavida MJ (1996). Clutch size and body size at first reproduction in *Daphnia pulicaria* at different levels of food and predation. *Journal of Plankton Research* **18**:863-880.
- Gliwicz ZM e Guisande C (1992). Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels. *Oecologia* **91**:463-467.
- Guisande C e Gliwicz ZM (1992). Egg size and clutch size in two *Daphnia* species grown at different food levels. *Journal of Plankton Research* **14**:997-1007.
- Hairton NG Jr (1996). Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnology and Oceanography* **41**:1087-1092.
- Hochstädter S (2000). Seasonal changes of C:P ratios of seston, bacteria, phytoplankton and zooplankton in a deep, mesotrophic lake. *Freshwater Biology* **44**:453-463.
- Hrbáček J (1987). Systematics and biogeography of *Daphnia* species in the northern temperate regions. In *Daphnia – Memorie dell'istituto italiano di idrobiologia* dott. Marco de Marchi. Consiglio Nazionale delle ricerche – Istituto Italiano di Idrobiologia – Verbania Pallanza. USA. Pp37-76.
- Kilham SS, Kreeger DA, Goulden CE e Lynn SG (1997). Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Freshwater Biology* **38**:639-647.
- Kleiven OT, Larsson P e Hobæk A (1992). Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos* **65**:197-206.
- Lampert W (1978). A field study on the dependence of the fecundity of *Daphnia* spec. on food concentration. *Oecologia* **36**:363-369.

- Lampert W (1987). Feeding and nutrition in *Daphnia*. In *Daphnia – Memorie dell'istituto italiano di idrobiologia* dott. Marco de Marchi. Consiglio Nazionale delle ricerche – Istituto Italiano di Idrobiologia – Verbania Pallanza. USA. pp143-192.
- Larsson P (1991). Intraspecific variability in response to stimuli for male and ehippia formation in *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* **225**:281-290.
- Laurén-Määttä C, Hietala J e Walls M (1997). Responses of *Daphnia pulex* populations to toxic cyanobacteria. *Freshwater Biology* **37**:635-647.
- Leaf SS e Chatterjee R (1999). Developing a strategy on eutrophication. *Wat. Sci. Tech.* **39**(12):307-314.
- Legendre L e Legendre P (1979). Écologie numérique. 1. Le traitement multiple des données écologiques. 2. La structure des données écologiques. Masson et Les Presses de l'Université du Québec (ed.), Vol. I e Vol. II, 1ª ed., Paris, 197+284 pp.
- Lürling M e Van Donk E (1997). Life history consequences for *Daphnia pulex* feeding on nutrient-limited phytoplankton. *Freshwater Biology* **38**:693-709.
- Martinez G e Montecino V (2000). Competencia en Cladocera: implicancias de la sobreposición en el uso de los recursos tróficos. *Revista Chilena de Historia Natural* **73**:787-795.
- Medina-Sánchez JM, Villar-Argaiz M, Sánchez-Castillo P, Cruz-Pizarro L e Carrillo P (1999). Structure changes in a planktonic food web: biotic and abiotic controls. *Journal of Limnology* **58**(2):213-222.
- Mellors WK (1975). Selective predation of ehippial *Daphnia* and the resistance of ehippial eggs to digestion. *Ecology* **56**(4):974-980.

- Meyer JS, Ingersoll CG, McDonald LL e Boyce MS (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: JackKnife vs. Bootstrap techniques. *Ecology* **67**(5):1156-1166.
- Michels E e De Meester L (1998). The influence of food on the phototatic behaviour of *Daphnia magna* Straus. *Hydrobiologia* **379**:199-206.
- Montel ML e Lair N (1997). Relationships between heterotrophic nanoflagellates and the demographic response of *Daphnia longispina* in a eutrophic lake poor food quality conditions. *Freshwater Biology* **38**:739-752.
- Moreira dos Santos M (1998). The controlled production and hatching of *ephippia* of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) for toxicity testing. Ph. D. Thesis, University of Ghent, Belgium. pp. 372.
- Moritz C (1987). A note on the hatching and viability of *Ceriodaphnia* ephippia collected from lake sediment. *Hydrobiologia* **145**:309-314.
- Nauwerck A (1960). Zur Systematik und Ökologie portugiesischer Planktonalgen. *Bol. Soc. Brot.* XI: 7-56.
- Ojala A, Kankaala P, Kairesalo T e Salonen K (1995). Growth of *Daphnia longispina* L. in a polyhumic lake under various availabilities of algal, bacterial and detrital food. *Hydrobiologia* **315**:119-134.
- Pancella JR e Stross RG (1963). Light induced hatching of *Daphnia* resting eggs. *Chesapeake Science* **4**(3):135-140.
- Pereira R (1997). Plano de ordenamento e gestão das lagoas das Braças e da Vela (centro-litoral). Dissertação de Mestrado em Ecologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 1997, pp. 142

- Pijanowska J e Stolpe G (1996). Summer diapause in *Daphnia* as a reaction to the presence of fish. *Journal of Plankton Research* **18**(8):1407-1412.
- Proctor VW (1964). Viability of crustacean eggs recovered from ducks. *Ecology* **45**(3):656-658.
- Repka S (1997). Effects of food type on the life history of *Daphnia* clones from lakes differing in trophic state. I. *Daphnia galeata* feeding on *Scenedesmus* and *Oscillatoria*. *Freshwater Biology* **37**:675-683.
- Repka S (1998). Effects of food type on the life history of *Daphnia* clones from lakes differing in trophic state. II. *Daphnia cucullata* feeding on mixed diets. *Freshwater Biology* **38**:685-692.
- Ryther JH (1954). Inhibitory effects of phytoplankton upon the feeding of *Daphnia magna* with reference to growth, reproduction and survival. *Ecology* **35**:522-533.
- Sanders RW e Porter KG (1990). Bacterivorous flagellates as food resources for the freshwater zooplankter *Daphnia ambigua*. *Limnology and Oceanography* **35**(1):188-191.
- Silva PCLD (1999). Lagoa das Braças: um caso de estudo do processo de eutrofização. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, pp. 83
- Soares AMVM (1989). Clonal variation in life-history traits in *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). Implications for ecotoxicology. Dissertação de Doutoramento, Universidade de Sheffield, Sheffield, U.K.. pp. 162.
- Sobral OMF (1997). Ecotoxicidade de efluentes de indústrias de pasta de papel resultantes de diferentes processos de pré-branqueamento, Dissertação de Mestrado em Ecologia, Universidade de Coimbra, Coimbra.

- Spaak P (1995). Sexual reproduction in *Daphnia*: interspecific differences in a hybrid species complex. *Oecologia* **104**:501-507.
- Stein JR (1973). Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge. University Press, London, UK, pp. 7-24
- Stross RG (1966). Light and temperature requirements for diapause development and release in *Daphnia*. *Ecology* **47**(3):368-374.
- Stross RG e Hill JC (1965). Diapause induction in *Daphnia* requires two stimuli. *Science* **150**:1462-1464.
- Stross RG e Hill JC (1968). Photoperiod control of winter diapause in the freshwater crustacean, *Daphnia*. *Biological Bulletin* **134**:176-198.
- Taylor BE (1985). Effects of food limitation on growth and reproduction of *Daphnia*. *Archiv für Hydrobiologie Ergebnisse der Limnologie* **21**:285-296.
- Weithoff G, Lorke A e Walz N (2000). Effects of water-column mixing on bacteria, phytoplankton, and rotifers under different levels of herbivory in a shallow lake. *Oecologia* **125**:91-100.
- Wylie JL e Currie DJ (1991). The relative importance of bacteria and algae as food sources for crustacean zooplankton. *Limnology and Oceanography* **36**(4):708-728.
- Yampolsky LY (1992). Genetic variation in the sexual reproduction rate within a population of a cyclic parthenogen, *Daphnia magna*. *Evolution* **46**(3):833-837.
- Zaffagnini F (1987). Reproduction in *Daphnia*. In *Daphnia – Memorie dell'istituto italiano di idrobiologia* dott. Marco de Marchi. Consiglio Nazionale delle ricerche – Istituto Italiano di Idrobiologia – Verbania Pallanza. USA. Pp245-284.

Zar JH (1996). Biostatistical analysis. 3rd Edition. Prentice-Hall International Inc.. New Jersey.  
pp. 662.



## **Anexos**

## Tabela de preparação do aditivo orgânico e seus volumes na utilização

### Preparação do Extracto de Algas

#### Diluição

Volume retirado da sol. concentrada	Volume final da sol. stock	Valor da absorvância a 440 nm
$\pm 18$ ml	2000 ml	$\pm 0.62$

**ATENÇÃO:**

Filtrar o extracto por uma membrana de 0,2  $\mu$ m em vácuo para retirar impurezas.

#### Volume de Extracto de Algas a Adicionar ao ASTM

Volume de ASTM (ml)	Volume da sol. stock de extracto de algas (ml)
50	0.30
80	0.48
100	0.60
120	0.72
800	4.80
1000	6.00

### Tabelas de Alimentação para *Daphnia* sp.

Relação entre a absorvância e o número de células cel/ml= $-17107.5 + \text{Abs} \times 7.92535 \times 10^6$							
Concentração de alimento no meio de cultura: $3.0 \times 10^5$ cel/ml/ <i>Daphnia</i>							
Volume algal de <i>Selenastrum capricornutum</i> a utilizar na alimentação de <i>Daphnia</i> sp.							
Stock de algas	Volume de Meio de Cultura de <i>Daphnia</i> sp. (ml)						
A (1/10)	25	50	75	100	120	800	1000
0.400	0.237	0.473	0.710	0.946	1.135	7.57	7.57
0.405	0.234	0.468	0.701	0.935	1.121	7.47	7.47
0.410	0.231	0.461	0.692	0.922	1.106	7.38	7.38
0.415	0.228	0.456	0.684	0.912	1.099	7.30	7.30
0.420	0.225	0.451	0.676	0.901	1.081	7.21	7.21
0.425	0.223	0.445	0.668	0.890	1.068	7.12	7.12
0.430	0.220	0.440	0.660	0.880	1.056	7.04	7.04
0.435	0.218	0.435	0.653	0.870	1.044	6.96	6.96
0.440	0.215	0.430	0.645	0.860	1.032	6.88	6.88
0.445	0.213	0.425	0.638	0.850	1.020	6.80	6.80
0.450	0.210	0.421	0.631	0.841	1.009	6.73	6.73
0.455	0.208	0.416	0.623	0.831	0.997	6.65	6.65
0.460	0.206	0.411	0.617	0.822	0.986	6.58	6.58
0.465	0.203	0.407	0.610	0.813	0.975	6.51	6.51
0.470	0.201	0.403	0.604	0.805	0.966	6.44	6.44
0.475	0.199	0.398	0.597	0.796	0.955	6.37	6.37
0.480	0.197	0.394	0.591	0.788	0.945	6.31	6.31
0.485	0.195	0.390	0.585	0.780	0.936	6.24	6.24
0.490	0.193	0.386	0.579	0.772	0.926	6.18	6.18
0.495	0.191	0.383	0.574	0.765	0.918	6.12	6.12
0.500	0.189	0.378	0.567	0.756	0.907	6.05	7.56
0.505	0.187	0.374	0.561	0.748	0.897	5.99	7.48
0.510	0.186	0.371	0.557	0.742	0.890	5.94	7.42
0.515	0.184	0.368	0.551	0.735	0.882	5.88	7.35

Continuação

A (1/10)	25	50	75	100	120	800	1000
0.520	0.182	0.364	0.545	0.727	0.872	5.82	7.27
0.525	0.180	0.360	0.540	0.720	0.864	5.76	7.20
0.530	0.178	0.357	0.535	0.713	0.855	5.71	7.13
0.535	0.177	0.354	0.530	0.707	0.848	5.66	7.07
0.540	0.175	0.351	0.526	0.701	0.841	5.55	7.01
0.545	0.173	0.347	0.520	0.693	0.831	5.50	6.93
0.550	0.172	0.344	0.515	0.687	0.824	5.45	6.87
0.555	0.170	0.341	0.511	0.681	0.817	5.40	6.81
0.560	0.169	0.338	0.506	0.675	0.810	5.36	6.75
0.565	0.168	0.335	0.503	0.670	0.804	5.29	6.70
0.570	0.165	0.331	0.496	0.661	0.793	5.26	6.61
0.575	0.164	0.329	0.493	0.657	0.788	5.22	6.57
0.580	0.163	0.326	0.489	0.652	0.782	5.17	6.52
0.585	0.162	0.323	0.485	0.646	0.775	5.13	6.46
0.590	0.160	0.321	0.481	0.641	0.769	5.11	6.41
0.595	0.159	0.318	0.477	0.636	0.763	5.09	6.36
0.600	0.158	0.315	0.473	0.630	0.756	5.04	6.30
0.605	0.156	0.313	0.469	0.625	0.750	5.00	6.25
0.610	0.155	0.310	0.465	0.620	0.744	4.96	6.20
0.615	0.154	0.308	0.461	0.615	0.738	4.92	6.15
0.620	0.153	0.305	0.458	0.610	0.732	4.88	6.10
0.625	0.151	0.303	0.454	0.605	0.726	4.84	6.05
0.630	0.150	0.300	0.450	0.600	0.720	4.80	6.00
0.635	0.149	0.298	0.447	0.596	0.715	4.77	5.96
0.640	0.148	0.296	0.443	0.591	0.709	4.73	5.91
0.645	0.147	0.293	0.440	0.586	0.703	4.69	5.86
0.650	0.146	0.291	0.437	0.582	0.698	4.66	5.82
0.655	0.144	0.289	0.433	0.577	0.692	4.62	5.77
0.660	0.143	0.287	0.430	0.573	0.696	4.59	5.73

Continuação

A (1/10)	25	50	75	100	120	800	1000
0.665	0.142	0.284	0.426	0.568	0.670	4.55	5.68
0.670	0.141	0.282	0.422	0.563	0.675	4.51	5.63
0.675	0.140	0.280	0.420	0.560	0.672	4.48	5.60
0.680	0.139	0.278	0.417	0.556	0.667	4.45	5.56
0.685	0.138	0.276	0.414	0.552	0.662	4.42	5.52
0.690	0.137	0.274	0.411	0.548	0.657	4.39	5.48
0.695	0.136	0.272	0.407	0.543	0.651	4.35	5.43
0.700	0.135	0.270	0.405	0.540	0.648	4.32	5.40
0.705	0.134	0.268	0.402	0.536	0.643	4.29	5.36
0.710	0.133	0.266	0.399	0.532	0.638	4.26	5.32
0.715	0.132	0.264	0.396	0.528	0.633	4.23	5.28
0.720	0.131	0.263	0.394	0.525	0.630	4.20	5.25
0.725	0.130	0.261	0.391	0.521	0.625	4.17	5.21
0.730	0.129	0.259	0.388	0.517	0.620	4.14	5.17
0.735	0.129	0.258	0.386	0.515	0.618	4.12	5.15
0.740	0.128	0.256	0.383	0.511	0.613	4.09	5.11
0.745	0.127	0.254	0.380	0.507	0.608	4.06	5.07
0.750	0.126	0.252	0.377	0.503	0.603	4.03	5.03
0.755	0.125	0.251	0.376	0.501	0.601	4.01	5.01
0.760	0.124	0.249	0.373	0.497	0.596	3.98	4.97
0.765	0.123	0.247	0.370	0.493	0.591	3.95	4.93
0.770	0.123	0.246	0.368	0.491	0.589	3.93	4.91
0.775	0.122	0.244	0.365	0.487	0.584	3.90	4.87
0.780	0.121	0.243	0.364	0.485	0.582	3.88	4.85
0.785	0.120	0.241	0.361	0.481	0.577	3.85	4.81
0.790	0.120	0.239	0.359	0.478	0.573	3.83	4.78
0.795	0.119	0.238	0.357	0.476	0.571	3.81	4.76
0.800	0.118	0.237	0.355	0.473	0.567	3.78	4.73
0.805	0.118	0.235	0.353	0.470	0.564	3.76	4.70

Continuação

<b>A (1/10)</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>75</b>	<b>100</b>	<b>120</b>	<b>800</b>	<b>1000</b>
<b>0.810</b>	<b>0.117</b>	<b>0.233</b>	<b>0.350</b>	<b>0.466</b>	<b>0.559</b>	<b>3.73</b>	<b>4.66</b>
<b>0.815</b>	<b>0.116</b>	<b>0.232</b>	<b>0.347</b>	<b>0.463</b>	<b>0.556</b>	<b>3.71</b>	<b>4.63</b>
<b>0.820</b>	<b>0.115</b>	<b>0.231</b>	<b>0.346</b>	<b>0.461</b>	<b>0.553</b>	<b>3.69</b>	<b>4.61</b>
<b>0.825</b>	<b>0.115</b>	<b>0.229</b>	<b>0.344</b>	<b>0.458</b>	<b>0.549</b>	<b>3.67</b>	<b>4.58</b>
<b>0.830</b>	<b>0.114</b>	<b>0.228</b>	<b>0.341</b>	<b>0.455</b>	<b>0.546</b>	<b>3.64</b>	<b>4.55</b>
<b>0.835</b>	<b>0.113</b>	<b>0.226</b>	<b>0.339</b>	<b>0.452</b>	<b>0.542</b>	<b>3.62</b>	<b>4.52</b>
<b>0.840</b>	<b>0.113</b>	<b>0.225</b>	<b>0.338</b>	<b>0.450</b>	<b>0.540</b>	<b>3.60</b>	<b>4.50</b>
<b>0.845</b>	<b>0.112</b>	<b>0.224</b>	<b>0.335</b>	<b>0.447</b>	<b>0.536</b>	<b>3.58</b>	<b>4.47</b>
<b>0.850</b>	<b>0.111</b>	<b>0.223</b>	<b>0.334</b>	<b>0.445</b>	<b>0.534</b>	<b>3.56</b>	<b>4.45</b>
<b>0.855</b>	<b>0.111</b>	<b>0.221</b>	<b>0.332</b>	<b>0.442</b>	<b>0.530</b>	<b>3.54</b>	<b>4.42</b>
<b>0.860</b>	<b>0.110</b>	<b>0.220</b>	<b>0.330</b>	<b>0.440</b>	<b>0.528</b>	<b>3.52</b>	<b>4.40</b>
<b>0.865</b>	<b>0.109</b>	<b>0.219</b>	<b>0.328</b>	<b>0.437</b>	<b>0.524</b>	<b>3.50</b>	<b>4.37</b>
<b>0.870</b>	<b>0.109</b>	<b>0.218</b>	<b>0.326</b>	<b>0.435</b>	<b>0.522</b>	<b>3.48</b>	<b>4.35</b>
<b>0.875</b>	<b>0.108</b>	<b>0.216</b>	<b>0.324</b>	<b>0.432</b>	<b>0.518</b>	<b>3.46</b>	<b>4.32</b>
<b>0.880</b>	<b>0.108</b>	<b>0.215</b>	<b>0.323</b>	<b>0.430</b>	<b>0.516</b>	<b>3.44</b>	<b>4.30</b>
<b>0.885</b>	<b>0.107</b>	<b>0.214</b>	<b>0.320</b>	<b>0.427</b>	<b>0.512</b>	<b>3.42</b>	<b>4.27</b>
<b>0.890</b>	<b>0.106</b>	<b>0.213</b>	<b>0.319</b>	<b>0.425</b>	<b>0.510</b>	<b>3.40</b>	<b>4.25</b>
<b>0.895</b>	<b>0.106</b>	<b>0.211</b>	<b>0.317</b>	<b>0.422</b>	<b>0.506</b>	<b>3.38</b>	<b>4.22</b>
<b>0.900</b>	<b>0.105</b>	<b>0.210</b>	<b>0.315</b>	<b>0.420</b>	<b>0.504</b>	<b>3.36</b>	<b>4.20</b>

**Teste Crónico - *Daphnia longispina***Réplica 

Nascimento: \_\_\_\_\_  
 Tratamento: \_\_\_\_\_  
 Longevidade: \_\_\_\_\_

Morte: \_\_\_\_\_  
 Início do teste: \_\_\_\_\_  
 População: \_\_\_\_\_

Dias	Data	Hora	Tam. Muda (1º exopódito)		Ninhada	Nº Juvenis	<i>Ephippia</i>
			(divisões)	(mm)			
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							

Ninhada	Nº Indiv.	Medições dos neonatos (div.)	Nº epd.	Tara	Biomassa	Biom. Média
				(papel Al)	(Ind.+Papel)	Ind.
N1						
N2						
N3						
N4						
N5						
N6						

Observações: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_